



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102316892 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 04

(21) 申请号 201080009256. 9

A61P 3/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 02. 10

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

P200900396 2009. 02. 12 ES

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/ES2010/070072 2010. 02. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/092218 ES 2010. 08. 19

(73) 专利权人 西马生物医学计划公司

地址 西班牙纳瓦拉

专利权人 纳瓦拉大学

(72) 发明人 赫苏斯·玛丽亚·普列托·巴尔图埃

纳

马蒂尔德·布斯托斯·德·阿凡霍

玛丽亚·赫苏斯·莫雷尼奥·阿里阿

加

Mark A. Febbraio. “gp130 receptor

ligands as potential therapeutic targets

for obesity”. 《Journal of Clinical

Investigation》. 2007, 第 117 卷 (第 4 期), 第

841 页 - 第 849 页.

Sanjin Zvonic et al.,. “Effects of

Cardiotrophin on Adipocytes”. 《The Journal

of Biological Chemistry》. 2004, 第 279 卷 (第

46 期), 第 47572 页 - 第 47579 页.

B. Macros-Gomez et al.,. “Obesity,

inflammation and insulin resistance :role

of gp 130 receptor ligands”. 《An Sist Sanit

Navar》. 2008, 第 31 卷 (第 2 期), 第 113 页 - 第

123 页.

审查员 刘贺

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限

公司 32200

代理人 楼高潮

(51) Int. Cl.

A61K 38/19 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书18页 附图23页

(54) 发明名称

心肌营养素 -1 用于治疗代谢病的用途

(57) 摘要

本发明涉及心肌营养素 -1 (CT-1) 在治疗肥胖和其他相关病症中的应用, 这些病症包括高血糖症、胰岛素抵抗、2 型糖尿病和异常血脂症, 并且提供了该化合物的抑制食欲、刺激脂肪氧化、降低血糖的作用, 该化合物还是在骨骼肌水平上胰岛素作用的敏化剂和通过肠上皮细胞的葡萄糖肠内转运的抑制剂。

1. 心肌营养素 -1 在用于治疗代谢病的药物的制备中的用途,其中代谢病选自肥胖、高血糖症、胰岛素抵抗、2 型糖尿病和异常血脂症。

2. 心肌营养素 -1 在制备用于治疗 1 级超重或 2 级超重的美容组合物中的用途。

3. 如权利要求 1 所述的用途,其中施用所述化合物以用于急性或者缓慢治疗。

4. 一种组合物,其包含心肌营养素 -1 和抗糖尿病化合物,其中所述抗糖尿病化合物是胰岛素。

5. 如权利要求 4 所述的组合物在用于治疗代谢病的药物的制备中的用途,其中所述组合物同时或顺序施用并且其中所述代谢疾病选自肥胖、胰岛素抵抗、高血糖症、异常血脂症和 2 型糖尿病。

6. 根据权利要求 4 所述的组合物在制备用于治疗 1 级超重或 2 级超重的组合物中的用途。

7. 如权利要求 6 所述的用途,其中的治疗是急性的或缓慢的。

心肌营养素 -1 用于治疗代谢病的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及心肌营养素 -1 用于治疗肥胖症和其他相关病症的用途,例如:高血糖症、胰岛素抵抗、2 型糖尿病和异常脂血症等,心肌营养素具有抑制食欲的功能,能够作为脂肪氧化刺激剂、骨骼肌水平上胰岛素作用的降血糖敏化剂和通过肠上皮细胞的葡萄糖肠内转移的抑制剂。

技术背景

[0002] 肥胖症是严重的公共健康问题,在很多发达国家已经达到了一个流行病的比例 (Bellanger and Bray,2005, J The State Med Soc ;157 :S42-49 ;quiz 49)。在我们发达国家,食物摄入量的增加、不健康的饮食习惯以及久坐的生活方式毋庸置疑地导致了肥胖症激增 (Stein and Colditz et al.,2004, J.Clin.Endocrinol.Metab. 89 :2522-5)。许多研究表明,肥胖症和其他代谢疾病流行程度的令人担忧的增长都与胰岛素抵抗、异常脂血症和势必导致 2 型糖尿病和该疾病承担的所有后果的胰腺 β 细胞的最终衰竭有关 (Rana et al.,2007, Diabetes Obes.Metab. ,9 :218-232)。

[0003] 现有的肥胖症的治疗如下:i) 赛尼可 (奥利司他) 是一种胃肠脂肪酶抑制剂,它能够适量地减轻体重,但是其主要问题是会带来不良的胃肠作用,包括结肠癌;ii) 西布曲明是一种单胺捕获抑制剂,相比其他的治疗,它能更大程度地减轻体重,但是其与血压升高、心输出量提高有关;iii) 最后,利莫那班在欧洲被批准使用 (尽管没有被 FDA 批准),该药物是一种内源性大麻素受体拮抗剂,但是它同样会导致情绪行为的变化,如抑郁症等,正因为这个原因,它已经退出市场。

[0004] 关于目前胰岛素抵抗的治疗,一般是利用噻唑烷二酮类 (TZD) 和其他疗法联合治疗。这些药物的问题在于会引起体重增加,尤其是当它们与胰岛素共同施用的时候。总而言之,在这些病理学中最感兴趣的研究是一种能够敏化或增加胰岛素的作用,同时还能够降低体重的试剂。此外,对于外周作用如肠内葡萄糖抑制的治疗在肥胖症和糖尿病中也是很受关注的。

[0005] 1994 年底,瘦素的发现为研究由调控能量平衡的脂肪细胞所分泌的因子开辟了新视野。该蛋白主要是由脂肪细胞产生和分泌的,其分泌量与脂肪质量是成比例的。除了提高脂肪氧化和促进肌肉捕获葡萄糖的外周作用,上述蛋白还被确定是调控食欲的中枢神经系统调节剂。然而,很快就观测到肥胖和高瘦素水平有关,并且内源性的瘦素没有效果,正因为这个原因,大部分的肥胖人群和啮齿动物是瘦素耐受的,因此,这种治疗武器仅仅限于那些具有导致瘦素缺失的疾病的个体 (只占肥胖人群的很低的比例)。

[0006] 由于瘦素和 gp-130 家族的细胞因子在结构上很相似,瘦素受体 (LRb) 和 gp-130 细胞因子受体,即 gp-130R β ,在结构上也很相似,因此,对 gp130 细胞因子家族的其他成员,尤其是 CNTF,能够作为治疗肥胖症的治疗剂以克服在肥胖个体中观察到的瘦素耐受的问题进行了研究。

[0007] 已知 CNTF 细胞因子对患有肥胖症、胰岛素抵抗和脂肪肝的小鼠具有潜在的治疗

潜力,因为它改善了所有的这些参数 (Sleeman et al., 2003, Proc Natl Acad. Sci. USA, 100 :14297-14302)。CNTF 的抑制食欲的作用 (Stephens TW et al., 1995)、该细胞因子通过 AMPK 激活能力来恢复胰岛素抵抗的能力 (Watt et al., 2006, Nat. Med., 12 :541-548) 以及刺激肌肉捕获葡萄糖的能力 (Steinberg et al., 2009, Diabetes, Epub January, 09, 2009) 都已经进行了描述,这导致建议所述细胞因子作为肥胖症和相关疾病的可能的治疗 (Ahima et al., 2006, Nat. Med., 12 :511-512)。然而,所述细胞因子作为治疗剂的用途被脂肪和肌肉组织中的 CNTFR α 受体的低表达、CNS 的高数量、抗 -CNTF 抗体的产生所限制。使用该细胞因子对患者进行临床实验,患者体重约为 114kg,以 1 ~ 2mg/kg 的剂量施用 84 天后,患者体重下降 3 ~ 4kg。同时这些结果表明,施用高剂量的 CNTF 患者表现出了恶心,而在抗 -CNTF 抗体产生后他们的体重又出现增加 (Ettinger M. P. et al., JAMA, 2003, 289 : 1826-32)。

[0008] 因此,本领域技术中需要一种能用于肥胖症治疗的试剂,该试剂没有目前已知的 gp130 基配体的那些缺点。

[0009] 发明概述

[0010] 第一方面,本发明涉及诱导用于治疗代谢病的心肌营养素 -1 (CT-1) 活性的化合物,并涉及诱导心肌营养素 -1 (CT-1) 活性的化合物在用于治疗代谢病的药物的制备中的用途。

[0011] 另一方面,本发明涉及治疗肥胖症的美容方法,包括给患者施用药物活性剂量的能够诱导心肌营养素 -1 活性的化合物。

[0012] 另一方面,本发明涉及组合物,共同或者独立地,其包含一种能够诱导心肌营养素活性的化合物和一种抗糖尿病化合物。其他方面,本发明还涉及根据本发明用于治疗代谢病的组合物,其中所述组合物同时、独立或连续地被施用,还涉及根据本发明的组合物在用于治疗代谢病的药物的制备中的用途,其中组合物同时、独立或连续地被施用。

[0013] 另一方面,本发明涉及治疗肥胖症的美容方法,包括给患者施用药物活性剂量的本发明的组合物。

附图说明

[0014] 图 1 :心肌营养素 -1 减少具有高脂肪饮食诱导肥胖症的小鼠的体重。(S :血清, rCT-1 的施用载体)。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 8 个动物每组。**p < 0.01 ;***p < 0.001。

[0015] 图 2 :CT-1 介导的具有高脂肪饮食诱导肥胖症的小鼠的体重下降,至少部分是由于抑制食欲的效果导致的。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 8 个动物每组。*p < 0.05。

[0016] 图 3 :心肌营养素 -1 减少正常饮食 (NCD) 小鼠的体重。(S :血清, rCT-1 的施用载体)。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 5 个动物每组。**p < 0.01 ;***p < 0.001。

[0017] 图 4 :CT-1 介导的体重下降是由于除抑制食欲作用之外的因子 (结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 6 个动物每组, *p < 0.05)。成对饲养 (PF) 组是指与 CT-1 治疗的小鼠的日摄入量一样的一组小鼠。

[0018] 图 5 :向 C57BL/6 (3 月龄) 小鼠急性静脉施用单剂量的 rCT-1 (10 μ g) 使基准血糖水平降低。在施用 rCT-1 后一小时后得到血糖水平、胰岛素和蛋白质印记,其中在肌肉中可

看到 AKT (P-AKT) 激活。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 5 个动物每组, *p < 0.05。

[0019] 图 6 :食用高糖后,急性施用单剂量的 rCT-1 (10 μ g) 防止血糖上升。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 5 个动物每组, *p < 0.05。

[0020] 图 7 :CT-1 对胰腺破坏 (使用链脲霉素) 的小鼠具有直接降低血糖的作用。单独施用 CT-1 降低了血糖水平,而当与胰岛素共同施用,这种效果得到提高。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 5 个动物每组, *p < 0.05, **p < 0.01, 与盐组相比。X 轴表示施用不同治疗后的时间,用分钟表示。

[0021] 图 8 :CT-1 的降血糖作用,至少部分是由于肌肉葡萄糖消耗的增加。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 5 个动物每组, *p < 0.05, **p < 0.01, 与盐组相比。

[0022] 图 9 :用 rCT-1 对具有高脂肪饮食诱导肥胖症的小鼠进行 6 天缓慢治疗后的葡萄糖和胰岛素水平。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 7 个动物每组, *p < 0.05。

[0023] 图 10 :在一周内用 rCT-1 治疗或限制卡路里 (PF) 之后的葡萄糖和胰岛素水平。PF (成对饲养) 组小鼠的日摄入量与 CT-1 治疗的小鼠一样。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 6 个动物每组。

[0024] 图 11 :心肌营养素 -1 抑制肠内葡萄糖转运 (体外治疗)。在 6 只不同的小鼠中进行 12 次测定,结果以平均数 $\pm$ SE 表示。**p < 0.01。

[0025] 图 12 :心肌营养素 -1 比 CNTF 具有更高的抑制肠内葡萄糖转运 (体外治疗) 的效果。在 6 只不同的小鼠中进行 24-35 次测定,结果以平均数 $\pm$ SE 表示。**p < 0.001。

[0026] 图 13 :心肌营养素 -1 抑制肠内葡萄糖转运 (体内急性治疗)。30 次测定的结果以平均数 $\pm$ SE 表示, n = 5 只老鼠每实验组。**p < 0.01。

[0027] 图 14 :心肌营养素 -1 抑制肠内葡萄糖转运 (体内缓慢治疗)。30 次测定的结果以平均数 $\pm$ SE 表示, n = 5 只老鼠每实验组。**p < 0.001。

[0028] 图 15 :心肌营养素 -1 抑制肠内葡萄糖转运 (在 Caco-2 细胞中研究)。每组 42-44 次测定的结果以平均数 $\pm$ SE 表示。

[0029] 图 16 :心肌营养素 -1 抑制脂肪细胞 (不是 CNTF) 中瘦素的释放 (脂肪细胞原代培养中的体外实验)。6 个独立的实验的结果以平均数 $\pm$ SE 表示, **p < 0.01 ;与对照相比 ***p < 0.001 ;^bp < 0.01 ;与胰岛素相比 ^cp < 0.001。

[0030] 图 17 :CT-1 和 CNTF 对脂解的差别效果。在 24 小时内,存在或不存在胰岛素的情况下,原代大鼠脂肪细胞中 CT-1 或 CNTF 产生的甘油释放量 (脂解测量)。n = 4-8 ;与对照细胞相比 *p < 0.05 ;与胰岛素处理的细胞相比 #p < 0.05。

[0031] 图 18 :CT-1 和 CNTF 对于典型来自分化成脂肪细胞的 3T3-L1 脂肪细胞中棕色脂肪组织的基因诱导的差别效果。在 24 小时内用 CT-1 或者 CNTF (20ng/mL) 处理细胞 (n = 5 ; *P < 0.05, 与对照细胞相比)。用定量 PCR 测定基因表达。

[0032] 图 19 :用 rCT-1 缓慢治疗 6 天后 IL-6 的血清水平。

[0033] 图 20 :图像表示分别用血清、CT-1 处理或用与 CT-1 处理的动物相同的饮食处理的 (成对饲养) 的 3 组的小鼠 (C57BL/6, 4 月龄) 的组织学肝脏切片 (H&E 100X)。在任何情况下都没有发现炎性浸润物。

[0034] 图 21 :摄入高脂肪后, rCT-1 降低了血清中游离脂肪酸 (FFA) 和甘油三酯 (TG) 的浓度。

[0035] 图 22 :脂肪乳剂注射后, rCT-1 清除血清中游离脂肪酸的效果。

[0036] 图 23 :急性施用 rCT-1 对骨骼肌的分离线粒体的 β 氧化的影响。数据对应平均数 $\pm$ SE ($n = ***, *P < 0.05$)。

[0037] 图 24 :用定量 PCR 测定 rCT-1 对涉及脂肪酸氧化的基因表达水平的影响。

[0038] 图 25 :在 L6E9 细胞中 (分化成肌管的成肌细胞), rCT-1 通过胰岛素对于葡萄糖 (2-脱氧葡萄糖) 摄入量的增强影响。在胰岛素的诱导下, 用 CT-1 急性 (1 小时) 和慢性 (24 小时) 治疗显著地增加了葡萄糖摄入量。与对照细胞相比, $*P < 0.05$; 与胰岛素处理的细胞相比, $\#P < 0.05$ 。

[0039] 图 26 :在 L6E9 细胞中 (分化成肌管的成肌细胞), rCT-1 对胰岛素信号的增强影响。(A) 用 rCT-1 急性治疗 (15 分钟) 和 (B) 用 rCT-1 缓慢治疗 (10 和 24 小时) 增强了胰岛素诱导的 AKT 磷酸化作用。

[0040] 图 27 :肌肉内, rCT-1 (急性治疗) 对“体内”胰岛素信号的增强影响。腔静脉注射胰岛素 30 分钟前, 用 rCT-1 ($10 \mu\text{g}$ /小鼠) 处理 4 月龄 C57BL/6 小鼠。5 分钟后提取腓肠肌并使其均化。观察到, CT-1 增强了肌肉中胰岛素诱导的 AKT 的磷酸化作用。密度计分析 ($n = 5$; $*P < 0.05$)。

[0041] 图 28 :肌肉内 rCT-1 (缓慢治疗) 对“体内”胰岛素信号的增强影响。6 天内用 rCT-1 (0.2mg/kg/天) 注射 4 月龄 C57BL/6 小鼠。对照组小鼠和上述小鼠具有相同的日摄入量, 并在 6 天内用盐水血清注射 (成对饲养)。16 小时的禁食后, 在动物的腔静脉中注射胰岛素, 5 分钟后提取腓肠肌并均化。观察到, CT-1 增强了肌肉中胰岛素诱导的 AKT 的磷酸化作用。密度计分析 ($n = 5$; $*P < 0.05$)。

[0042] 发明详述

[0043] CT-1 的医药和美容用途

[0044] 本发明的作者意外地观察到, 在正常饮食和高脂肪饮食喂养的小鼠中, CT-1 都能降低体重。所述效果至少部分依赖于 CT-1 的抑制食欲的作用 (图 2) 和在高脂肪饮食后降低血脂增加 (图 20 和 21)、在高糖饮食后降低血糖的作用 (图 5 ~ 6)、促进肌肉的葡萄糖消耗量 (图 8) 和降低肠对葡萄糖的捕获 (图 11 ~ 14)。此外, 本发明的作者还指出 CT-1 能够抑制脂肪细胞中基础瘦素分泌和胰岛素刺激的瘦素分泌, 同时能够诱导甘油释放并抑制胰岛素的抗脂解活性 (图 16 和 17)。然而, 使用 CNTF 并没有观察到上述效果。虽然没有依附特定的理论, 可以想到, 该差别效果给 CT-1 的使用带来了优势, 因为所述效果被加到该分子对肌肉中的作用中 (具有相应低血糖的葡萄糖捕获的刺激), 使得脂肪细胞中能够转化成为甘油三酯的葡萄糖减少。

[0045] 因此, 第一方面, 本发明涉及一种能够诱导心肌营养素 -1 (CT-1) 活性的用于治疗代谢病的化合物。此外, 本发明还涉及诱导心肌营养素 -1 活性的化合物在治疗代谢病的药物的制备中的用途, 还涉及治疗代谢病的方法, 其包括给患者施用能够诱导 CT-1 活性的化合物。

[0046] 本文中使用的术语“能够诱导心肌营养素 -1 活性的化合物”可以理解为任何化合物, 其施用能够提高心肌营养素 -1 活性, 而不用考虑所述提高是由于既存的 CT-1 特定活性的提高还是由于 CT-1 或其与心肌营养素基本具有相同功能的类似物的合成的提高。因此, 在优选的实施方案中, 诱导 CT-1 活性的试剂就是 CT-1 本身。“CT-1”指的是 UniProtKB 数据

库中 2008-12-16 版本 62 的登陆号 CTF1_HUMAN 或 Q16619 所示序列限定的蛋白质,对应人类心肌营养素同工型 1,或 2009.01.20 版本 1 中登陆号 Q5U5Y7 所示序列限定的蛋白,对应人类心肌营养素同工型 2,或其他物种中的直系同源,如小鼠 (UniProtKB 数据库,2008-12-16 版本 50 的登陆号 NP_031821 或 Q60753、2008-12-16 版本 42 的登陆号 NP_942155 或 P83714 所限定的序列),大鼠 (UniProtKB 数据库,2008-11-04 版本 50 的登陆号 NP_058825 或 Q63086、2009.01.20 版本 30 的登陆号 NP_001129272 或 Q6R2R3 所限定的序列)以及黑猩猩 (UniProtKB 数据库,2008-11-04 版本 30 的登陆号 NP_001009112 或 Q6R2R2 所限定的序列)。

[0047] 在另一实施方案中,诱导 CT-1 活性的制剂是 CT-1 的同功能变体。本文使用的表述“CT-1 的同功能变体”可以理解为任意的分子,其具有本申请中所述的 CT-1 的一个或多个功能,包括体内和体外,同时该分子具有最小的氨基酸序列同一性。因此,适用于本发明的 CT-1 变体是通过对上述序列进行插入、替换或缺失一个或多个氨基酸衍生而来的,包括天然等位基因,由于不同的加工而得到的变体、看起来天然的分泌和剪切型。优选地,所述 CT-1 变体具有与 CT-1 至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 的序列同一性。对于本领域技术人员来说同一性程度的确定方法是已知的。两个氨基酸序列之间的同一性优选使用 BLASTP 算法 [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215 :403-410 (1990)], 优选使用默认参数。另一方面,非限制性地,CT-1 的这些假想的变体具有 CT-1 的至少一种功能,例如:

[0048] - 在小鼠正常饮食和通过高脂肪饮食诱导肥胖喂养时,都能降低小鼠的体重的能力。在现有技术中已广泛描述了测定化合物降低体重的能力的方法,其中包括在本发明实施例 1 中描述的方法。在测定高脂肪饮食喂养的小鼠体重时,能使用任何本领域中已知的高脂肪食物,如被称为 D12450B 或 LFD 的能以脂肪形式提供 10% 千卡的饮食,被称为 D12451 或 HFD 的能以脂肪形式提供 45% 千卡的饮食,被称为 D12492 或 VHFD 的能以脂肪形式提供 60% 千卡的饮食。

[0049] - 诱导厌食效果的能力,其利用实施例 1 中描述的方法或者 W02007093363 中描述的方法进行测定。

[0050] - 降低呼吸商的能力,呼吸商是指 V_{O_2} 和 V_{CO_2} 之间的比值。该参数能够用本领域中已知的任意一种方法进行测定。

[0051] - 在高脂肪饮食后防止脂血(包括甘油三酯和游离脂肪酸)上升的能力,为此使用标准方法测定血浆中甘油三酯和游离脂肪酸的浓度,优选使用商业试剂盒。

[0052] - 直接降血糖能力,或者在高糖饮食后或胰腺破坏后的降血糖能力,这可使用市售的葡萄糖检测试剂盒测定。如实施例 3 中所述,链脲霉素或者促炎细胞因子(如 IL-1b, TNF- α 和 IFN- γ 形成的混合物, Choi et al. in Transplant Immunol., 2004, 13 :43-53)可导致胰腺破坏。

[0053] - 使肌肉的葡萄糖捕获提高的能力,其中用本发明实施例 3 所述的方法测定所述活性,该方法基于测定胃肌肉吸收葡萄糖标记的类似物的能力,或者使用如 Ueyama 等 (Biol. Signals Recept 2000 ;9 :267-274) 所描述的非同位素方法。

[0054] - 抑制胰岛素对于葡萄糖捕获和脂肪组织瘦素释放的效果的能力,为此能够使用

脂肪细胞的原代培养物和能够进行处理以促进分化为脂肪细胞的成纤维细胞系。能够使用商业葡萄糖检测试剂盒来进行通过脂肪细胞的葡萄糖释放。瘦素的测定可以使用商业试剂盒通过免疫测定 (ELISA, 放射性免疫测定等)。

[0055] 在另一实施方案中,能够诱导 CT-1 活性的试剂是编码 CT-1 或其同功能变体的多聚核苷酸。

[0056] 本发明中所述的术语“多聚核苷酸”是指任意长度的聚合物形式的核苷酸,其由核糖核苷酸和 / 或脱氧核糖核苷酸组成。该术语包括单链和双链的多聚核苷酸,也包括修饰的多聚核苷酸 (甲基化,受保护的等)。

[0057] 适合用作能够诱导 CT-1 活性的试剂的多聚核苷酸包括,但不限于: GenEMBL 数据库, 2008. 10. 15 版本 9 的登录号为 BC064416 的序列,对应于人类心肌营养素的转录本变体 1, 2009. 08. 12 版本 9 中的登录号为 BC036787 的序列,对应于人类心肌营养素的转录本的变体 1; GenEMBL 数据库, 2009. 01. 12 版本 4 的登录号为 D78591 的序列,对应于编码褐鼠 (大鼠) 心肌营养素 1 的多聚核苷酸; GenEMBL 数据库, 2009. 01. 12 版本 3 的登录号为 AY518205 的序列,对应于编码褐鼠 (大鼠) 心肌营养素 2 的多聚核苷酸; GenEMBL 数据库, 2009. 01. 12 版本 4 的登录号为 U18366 的序列,对应于编码小家鼠 (小鼠) 心肌营养素 1 的多聚核苷酸; GenEMBL 数据库, 2009. 01. 12 版本 2 的登录号为 AB125661 的序列,对应于编码小家鼠 (小鼠) 心肌营养素 2 的多聚核苷酸。

[0058] 可选地,能够诱导 CT-1 活性的试剂还包括之前通过其特定序列限定的这些多聚核苷酸的同功能变体。在本发明的上下文中,“同功能多聚核苷酸”可以理解为能编码之前所定义的具有 CT-1 活性的多肽的多聚核苷酸,它们通过在之前所述的序列上插入、缺失或替换一个或多个核苷酸产生。优选地,本发明的这些变体多聚核苷酸是这样的多聚核苷酸,其序列使其能与前述定义的多聚核苷酸在高限制性条件下进行杂交。典型的高限制性杂交条件包括用 $6\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$: 0.15M NaCl , 0.015M 柠檬酸钠) 和 40% 甲酰胺在 42°C 孵育 141 小时,然后在 60°C 用 $0.5\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS 洗涤一个或多个循环。可选地,高限制性条件还包括在 $6\times\text{SSC}$ 中于约 50°C 至 55°C 下进行杂交,以及最后用 $1-3\times\text{SSC}$ 在 68°C 下进行洗涤。中等限制性杂交条件包括在 0.2 或 0.3M NaCl 中于约 50°C 至 65°C 的温度下进行杂交,然后在约 50°C 至 55°C 下用 $0.2\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS (十二烷基硫酸钠) 进行洗涤。

[0059] 优选地,当能够诱导 CT-1 活性的试剂是多聚核苷酸时,这可操作地与表达调节区有关。本发明使用的调节序列可以是核启动子序列或可选地增强子序列和 / 或其他调节序列,这些序列能够提高异源核酸序列的表达。启动子可以是组成型启动子,也可以是诱导型启动子。如果想需要对异源核酸序列进行固定的表达,则使用组成型启动子。已知的组成型启动子的例子包括巨细胞病毒 (CMV) 前早期启动子, Rous 肉瘤病毒启动子等。其他的能够用于本发明实践的组成型启动子的例子是本领域技术人员所熟知的。如果需要对异源核酸序列的控制表达,则使用诱导型启动子。在非诱导状态下,诱导型启动子处于“沉默”状态。“沉默”是指在没有诱导子的存在下,检测不到或几乎检测不到异源核酸序列的表达,而在诱导子存在的情况下,才会有异源核酸序列的表达。通常,可通过改变诱导子的浓度来控制表达水平。通过控制表达,例如通过改变诱导子的浓度,从而致使诱导型启动子受到强的或弱的刺激,来控制异源核酸序列的转录本产物的浓度。在异源核酸序列编码一个基因的情况下,可以控制合成的蛋白质的量。通过这种方法,可以改变治疗产物的浓度。已知的

诱导型启动子的例子包括：雌激素或雄性激素启动子，金属硫蛋白启动子，蜕皮素响应启动子。许多其他的能够用于本发明实践的例子是本领域所熟知的。除了组成型和可诱导型启动子（它们在很多细胞或组织中起作用），可以使用组织特异性启动子来使特定核酸的异源序列在组织或细胞中表达。众所周知的这种组织特异性启动子的例子包括不同特异性肌肉启动子，包括骨骼 α -肌动蛋白启动子，心肌动蛋白启动子，骨骼肌钙蛋白 C 启动子，心肌钙蛋白 C 启动子，缓慢收缩，以及肌酸激酶启动子 / 增强子。能够用于本发明实践的肌肉特异性启动子的类型是本领域所熟知的（关于肌肉特异性启动子的综述，参见 Miller 等，(1993) Bioessays 15:191-196）。

[0060] 在另一实施方案中，能够诱导 CT-1 活性的试剂是包含上述多聚核苷酸即编码 CT-1 或其同功能变体的多聚核苷酸的载体。适合用于插入所述多聚核苷酸的载体是：原核生物中的表达载体，例如 pUC18、pUC19、pBluescript 及它们的衍生物，mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4，噬菌体和“穿梭”载体如 pSA3 及 pAT28，酵母表达载体如 2 微米质粒型载体、整合质粒、YEP 载体、着丝粒质粒等，昆虫细胞表达载体如 pAC 和 pVL 系列载体，植物表达载体如 pIB1、pEarleyGate、pAVA、pCambia、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pORE 系列等载体，以及真核细胞表达载体，其基于病毒载体（腺病毒、与腺病毒相关的病毒、逆转录病毒，特别是慢病毒）和非病毒载体，如 pSilencer 4.1-CMV (Ambion)、pcDNA3、pcDNA3.1/hygroCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVL 和 pKSV-10、pBPV-1、pML2d 和 pTDT1。

[0061] 在另一实施方案中，能够导致 CT-1 活性提高的试剂是一种能向培养基中分泌心肌营养素 -1 或其同功能变体的细胞。用于心肌营养素 -1 或其同功能变体的表达的合适的细胞包括但不限于：心肌细胞、脂肪细胞、内皮细胞、上皮细胞、淋巴细胞（B 细胞和 T 细胞）、肥大细胞、嗜酸性细胞、血管内膜细胞、从不同器官优选从胰岛分离出来的细胞的原代培养物、肝细胞、白细胞，包括单核、间质、脐带或成体白细胞（来自于皮肤、肺、肾脏和肝脏）、破骨细胞、软骨细胞和其他结缔组织细胞。一些已知的细胞系也同样合适，如 Jurkatt 细胞、NIH-3T3、CHO、Cos、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3 细胞，C2C12 成肌细胞和 W138 细胞。

[0062] 本领域技术人员能够意识到，可以将这些能够向培养基中分泌心肌营养素 -1 及其同功能变体的细胞制备成微粒或微囊形式，从而细胞在用于患者体内之前可以具有较长的使用寿命。制备作为本发明一个目标的微粒的合适材料包括任何生物相容性聚合材料，该材料作为细胞的支持物，能够使治疗性产物持续分泌。因此，所述的生物相容性聚合材料可以是例如热塑性聚合物或水凝胶聚合物。热塑性聚合物包括丙烯酸、丙烯酰胺、2-氨基乙基甲基丙烯酸酯、聚（四氟乙烯-六氟丙烯）、甲基丙烯酸烯-(7-cumaroxy) 乙基酯酸、N-异丙基丙烯酰胺、聚丙烯酸、聚丙烯酰胺、聚酰胺胺、聚（氨基）-对二甲苯、聚（氯乙基乙烯醚）、聚己内酯、聚（碳酸己内酯-共-三亚甲基）、聚（碳酸尿素）氨基甲酸乙酯、聚（碳酸盐）氨基甲酸乙酯、聚乙烯、聚乙烯共聚物和丙烯酰胺、聚乙二醇、聚乙二醇甲基丙烯酸酯、聚（乙烯对苯二酸酯）、聚（4-羟基丁基丙烯酸酯）、聚（羟乙基甲基丙烯酸酯）、聚（N-2-羟丙基甲基丙烯酸酯）、聚（乳酸-羟基乙酸）、聚（L 乳酸）、聚（ γ -甲基，L-谷氨酸）、聚（甲基甲基丙烯酸酯）、聚（丙烯延胡索酸酯）、聚（氧化丙烯）、聚吡咯、聚苯乙烯、聚（四氟乙烯）、聚氨酯、聚乙烯醇、超高分子量聚乙烯、6-(p-乙基苯甲酰胺)-己酸和 N-p-乙基基

苯甲基-D-麦芽糖酰胺以及包含上述一个以上聚合物的共聚物。水凝胶型的聚合物包括天然材料的藻酸盐、琼脂糖、胶原、淀粉、透明质酸、牛血清白蛋白、纤维素及其衍生物、胶质、硫酸软骨素、纤维蛋白、蚕丝蛋白以及合成水凝胶如 sefarose 和 sefadex。

[0063] 本领域所公知的是,除了相对可渗透外,上述的一些聚合物是不稳定的,倾向于失去它们的凝胶性质,这意味着抗体将会进入到它们内部并破坏细胞。为此,可选地,可以用半渗透膜包围本发明的微粒,这使得颗粒更加稳定,并形成一道抗体不可渗透的屏障。半透膜是指能够允许维持细胞活力所需的溶质进入并使由包含在微粒中的细胞所产生的治疗性蛋白出去的一层膜,但是这层膜对于抗体来说基本上是不可渗透的,因此细胞能够避免由包围微粒的有机体产生的免疫应答。合适的组成半透膜的材料是不溶于生物流体材料,优选聚氨基酸、如聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸、聚-L-精氨酸、聚-L-天冬酰胺酸、聚-L-天冬氨酸、聚苯甲基-L-天冬氨酸酯、聚-S-苯甲基-L-半胱氨酸、聚- γ -苯甲基-L-谷氨酸酯、聚-S-CBZ-L-半胱氨酸、聚- ϵ -CBZ-D-赖氨酸、聚- δ -CBZ-DL-鸟氨酸、聚-O-CBZ-L-丝氨酸、聚-O-CBZ-D-酪氨酸、聚(γ -乙基-L-谷氨酸酯)、聚-D-谷氨酸、聚氨基乙酸、聚- γ -N-己基-L-谷氨酸酯、聚-L-组氨酸、聚(α , β -[N-(2-羟乙基)-DL-天冬酰胺])、聚-L-羟基脯氨酸、聚(α , β -[N-(3-羟丙基)-DL-天冬酰胺)、聚-L-异亮氨酸、聚-L-亮氨酸、聚-D-赖氨酸、聚-L-苯丙氨酸、聚-L-脯氨酸、聚-L-丝氨酸、聚-L-苏氨酸、聚-DL-色氨酸、聚-D-酪氨酸或它们的组合物。

[0064] 本文使用的术语“代谢病”可以理解为导致新陈代谢错误或者失衡和以次佳形式发生的新陈代谢过程的所有类型的病症。该表述也指能够通过调节新陈代谢来进行治疗的疾病,尽管疾病本身并不是由于新陈代谢失调所引起的。在优选的实施方案中,代谢病选自肥胖、高血糖症、胰岛素抵抗、2型糖尿病和异常脂血症组成的组。

[0065] 本发明中使用的术语“肥胖”是指WHO根据体重指数(BMI)所提供的肥胖标准,BMI是指体重(kg)和身高(m)的平方的比值。根据这个标准,BMI值低于 18.5kg/m^2 被认为是体重不足或者纤瘦,BMI值在 $18.5\text{--}24.9\text{kg/m}^2$ 是正常体重,BMI值为 $25.0\text{--}29.9\text{kg/m}^2$ 是1级超重,BMI值在 $30.0\text{--}39.0\text{kg/m}^2$ 是2级超重,BMI值大于或等于 40.0kg/m^2 被认为是病态的肥胖。可选地,还有其他的方法可以确定个体肥胖度,例如测量腰部的直径,即在肋骨下沿到骨盆上沿之间的中点的距离(cm),皮肤皱襞的厚度,生物阻抗,生物阻抗的测定原理基于瘦肉的导电性好于肥肉。

[0066] 本发明中使用的术语“高血糖症”是指和禁食时的基准水平相比,出现不正常的高血糖水平的状态。特别的,高血糖症可以理解为禁食血糖水平持续高于 126mg/dL ,餐后血糖水平高于 140mg/dL ,和/或以 1.75g/kg 体重的剂量摄入葡萄糖后两个小时,静脉血浆中葡萄糖水平超过 200mg/dL 。

[0067] 本发明中使用的术语“胰岛素抵抗”是指其中细胞不能正确响应胰岛素的病症。结果,由于高血糖水平,体内会产生更多的胰岛素。胰岛素抵抗患者会经常表现出高葡萄糖水平和高循环胰岛素水平。胰岛素抵抗与肥胖症、高血压和高血脂极其相关。此外,2型糖尿病患者会频繁出现胰岛素抵抗。

[0068] 本发明中使用的术语“2型糖尿病”指的是以血糖水平不正常升高为特征的疾病,由于它影响大大小小的血管和神经,该疾病产生很多慢性并发症。该疾病中潜在的失调机制是被称为胰岛素抵抗的胰岛素作用的困难(组织对该激素敏感性的缺失)以及细胞分泌

胰岛素的不足。除了不断升高的血糖浓度,错误的胰岛素作用经常会转化成胆固醇和 / 或甘油三酯水平的升高。

[0069] 本发明中使用的术语“异常脂血症”是指以脂类代谢紊乱为特征的病理状态,这将会导致血液中脂类浓度(胆固醇、甘油三酯等)和脂蛋白(高密度脂蛋白)的相应失调。异常脂血症能够用本发明的方法进行治疗,这些病症包括,但不限于,高胆固醇血症、高甘油三酯血症、I、IIa、IIb、III、IV、V 型高脂蛋白血症、高乳糜微粒血症、混合型高脂血症等。

[0070] 本发明的组合物可用于治疗病态肥胖、1 级和 2 级超重,在这种情况下,本发明的方法也具有美容用途。因此,另一方面,本发明涉及一种治疗肥胖的美容方法,其包括给患者施用能够诱导心肌营养素-1 活性的化合物。在该实施方案中,能够使用该美容方法治疗的含有大量脂肪的超重患者能用肉眼进行确认,或者这些患者的 BMI 值大于或等于 25kg/m²,优选 25 至 30 之间。这些个体被认为是肥胖的,因为美容的原因需要控制体重。

[0071] 根据本发明的美容方法的不同实施方案是使用在治疗肥胖或其他代谢病的内容中所描述的能够诱导心肌营养素-1 活性的试剂。

[0072] 本发明的化合物能够施用,以用于急性或者缓慢治疗。本发明中使用的表述“缓慢施用”是指一种施用方法,其中向患者长时间连续施用该化合物,以便于在所述时间内维持治疗效果。缓慢施用的方式包括每天施用多种剂量的化合物,一天两次,一天三次,或者更高或更低的频率。在同一天内可以用周期施用的不同的静脉注射方式来进行缓慢施用。可选地,缓慢施用涉及以药丸形式或者连续输液形式进行,施用周期为每天一次,每 2 天一次,每 3 至 15 天一次,每 10 天一次或更多。典型地,缓慢施用持续至少 72 小时、至少 96 小时、至少 120 小时、至少 144 小时、至少 1 周、至少 2 周、至少 3 周、至少 4 周、至少 5 周、至少 6 周、至少 7 周、至少 8 周、至少 9 周、至少 10 周、至少 11 周、至少 12 周、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 9 个月、至少一年、至少 2 年或更长。

[0073] 本发明中使用的表述“急性施用”涉及一种施用方法,其中单剂量或多剂量的化合物在一个较短时间周期内给患者施用,例如,1、2、4、6、8、12 或 24 小时,或 2、3、4 天。

[0074] 本领域技术人员能够意识到活性化合物的治疗有效量和 / 或剂型是根据施用方式来进行选择的。这里使用的“治疗有效量”可以理解为能够全部或部分缓解代谢病相关症状的化合物量或者能够阻止症状发生或者恶化的量或者能够使有遭受该疾病风险的患者不会患上该疾病的量。

[0075] 如果需要缓慢施用本发明的化合物,该化合物可以持续释放化合物的形式施用,如 US5672659、US5595760、US5821221、US5916883 和 W09938536 等文献记载的那样。另外,如果需要急性施用,优选立即释放的治疗。在不考虑施用方式的情况下,可以个别地调整剂量和间隔,以提供足够维持其治疗效果的化合物的血浆水平。本领域具有普通经验的技术人员在无需大量实验即可使治疗有效局部剂量达到最优化。

[0076] 本发明化合物的施用需要其药物组合物的剂型,这构成了本发明的另一方面。在本发明的方法的实践中,有用的药物组合物包括治疗有效量的活性试剂和药学上可接受的载体。术语“药学上可接受”是指经联邦政府监管机构批准的,或者包括在美国药典或者其他公认药典中的,能够在动物中、优选人体内使用的。术语“载体”指的是化合物借以施用的稀释液、共佐剂、赋形剂、媒介物等。所述药物载体可以是无菌液体,如水和油类,包括石油、动物或植物油或合成油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。合适的药物赋形剂包括淀

粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、胶质、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、粉状脱脂乳、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物中也可以包含少量的湿润剂或乳化剂、或 pH 缓冲剂。组合物可以以溶液、悬浮液、片剂、药丸、胶囊、粉末、缓释剂型等形式存在。该组合物也可以通过黏合剂和传统的载体如甘油三酯制备成为栓剂。口服剂型包括标准的载体如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等的药物类型。合适的药物载体的例子在 E. W. Martin 的“雷明顿药物科学”中有所描述。

[0077] 该组合物可以以常规程序制备成药物组合物,其适用于人体静脉注射、皮下注射或肌肉注射。当需要的时候,组合物还能包括增溶剂和局部麻醉剂,如能缓解注射部位疼痛的利多卡因。当需要通过浸润施用组合物时,将组合物用于含有水或制药量的盐水溶液的浸润瓶。当需要通过注射施用组合物时,提供小水瓶以用于注射或无菌盐水溶液,从而组分在施用之前能够被混合。

[0078] 可以利用基于本说明书的常规临床技术进行测定 CT-1 活性诱导化合物的有效治疗代谢症的量。此外,也能够进行体外测试来辅助确定最佳的剂量范围。剂型中使用的精确剂量取决于施用途径、疾病的严重程度,同时还应该取决于医生的判断和患者的情况等。尽管如此,适合静脉注射的剂量范围大约在 50-5000mg 活性化合物 /kg 体重。适合鼻内施用的剂量范围大约在 0.01pg/kg 体重至 1mg/kg 体重之间。也可以对通过体外测定系统或动物体内得到的一对剂量响应曲线进行外推来得到有效剂量。

[0079] 对于全身性施用,可以先从体外测定估算出治疗有效剂量。例如,在动物模型中可以制定一个剂量以达到包括 IC₅₀ 的循环浓度范围的,其中 IC₅₀ 在细胞培养中测定。上述信息可以用来准确地确定人体内的有用剂量。也可以使用本领域中已知的技术手段,通过体内数据如动物模型估算得到初始剂量。本领域中有经验的技术人员可以通过动物的数据轻松优化给人类的施用。

[0080] 同样地,本发明也设想了能够诱导 CT-1 活性的试剂与一种或多种能够减少器官内营养物质有效性的化合物的联合应用,所述化合物具有抑制食欲或者抗肥胖的效果。因此,根据本发明中的代谢病治疗方法提供了联合、顺序或单独施用能够诱导 CT-1 活性的化合物和一种或多种化合物,上述一种或多种化合物选自糊精、糊精拮抗剂、鲑降钙素、缩胆囊素或其拮抗剂、瘦素 (OB 蛋白)、毒蜥外泌肽或其类似物、GLP1 或其拮抗剂、多肽 (PYY) 或其拮抗剂、影响神经传递介质或神经离子通道的试剂,例如抗抑郁剂,去甲肾上腺素捕获抑制剂、血清素 2c 受体拮抗剂、一些多巴胺拮抗剂、大麻素 1 型受体拮抗剂)、调节 CNS 中瘦素 / 胰岛素通路的试剂,包括瘦素类似物、瘦素转运促进子或瘦素受体促进子、CNTF、神经肽 Y、与刺鼠有关的肽拮抗剂、阿黑皮素原、可卡因、安非他明、 α -黑素细胞刺激荷尔蒙、黑皮色素-4 受体拮抗剂、影响胰岛素活性 / 代谢的试剂 (如蛋白质酪氨酸磷酸 1 β 抑制剂)、由过氧化物酶体 7 激活的受体拮抗剂、溴麦角环肽、生长激素抑制素拮抗剂、增加休息时代谢速率的试剂 (非耦联蛋白的拮抗剂、甲状腺荷尔蒙受体拮抗剂) 以及其他不同类型的拮抗剂,如黑色素、植物甾烷醇类似物、功能性油脂、脂肪酸合成抑制剂、羧肽酶抑制剂、肠内脂酶抑制剂等等。

[0081] 本发明的组合物

[0082] 令人惊奇地,本发明的作者发现,CT-1 和胰岛素联合施用对 1 型糖尿病模型降血糖效果以及对肌肉葡萄糖捕获的效果要比每种组分单独使用观察到的更加明显。因此,图 7

示出了用链脲霉素破坏小鼠的 β 胰腺细胞后,用 CT-1 和胰岛素联合治疗小鼠导致的降血糖要比单独施用每种组分观察到的效果更加明显。此外,图 8 示出了用 CT-1 和胰岛素联合治疗小鼠后,肌肉葡萄糖捕获的升高要比任意化合物单独施用观察到的更加明显。

[0083] 因此,另一方面,本发明涉及一种组合物(即本发明的组合物),包括,共同或者单独地,诱导心肌营养素活性的化合物和抗糖尿病化合物。

[0084] 表述“诱导心肌营养素活性的化合物”在上文治疗代谢病的方法中已有表述,其包括,正如本发明的第一个方法所述的,选自下列组中的化合物:

[0085] (i) 心肌营养素-1(CT-1),

[0086] (ii) CT-1 的同功能变体,

[0087] (iii) 编码 CT-1 或其同功能变体的多聚核苷酸,

[0088] (iv) 包含 (iii) 中所述的多聚核苷酸的载体,以及

[0089] (v) 能够向介质分泌心肌营养素-1 或其同功能变体的细胞,

[0090] 其中不同的化合物在之前已经有过详细地描述。

[0091] 本发明中使用的表述“抗糖尿病化合物”可以理解为在不考虑其作用机制的情况下,任何能够至少部分补偿糖尿病、包括高血糖症的症状的试剂。在优选的实施方案中,抗糖尿病化合物是诱导胰岛素活性的化合物或者是能够诱导胰岛素降血糖活性或针对胰岛素活性的敏化剂。

[0092] 诱导胰岛素活性的抗糖尿病化合物包括,但不限于:

[0093] (i) 胰岛素,

[0094] (ii) 胰岛素的同功能变体,

[0095] (iii) 编码胰岛素或其同功能变体的多聚核苷酸,

[0096] (iv) 包含 (iii) 中所述的多聚核苷酸的载体,

[0097] (v) 能够向介质分泌胰岛素-1 或其同功能变体的细胞。

[0098] 本发明使用的术语“胰岛素”是指任何物种(如灵长类动物,啮齿类动物或兔子)中的胰岛素,但是优选人源胰岛素,更优选天然序列的胰岛素,其包括与来自自然的胰岛素具有相同氨基酸序列的多肽。所述天然序列的胰岛素多肽能够从自然中分离或者通过重组和/或合成培养基制备。特别地,术语“天然序列的胰岛素”包含了截断或者分泌形式以及自然出现的等位基因变体。在本发明的实施方案中,天然序列的人类胰岛素是成熟的天然序列胰岛素或者具有包含 α 或 A 链以及 β 或 B 链的完整长度,其中 α 或 A 链对应人类前胰岛素原序列的 90 至 110 位氨基酸(UniProtKB 数据库,2009.01.20 版本 126,登录号 P01308), β 或 B 链对应 25 至 54 位氨基酸(NCBI 数据库,2009.01.20. 版本 126,登录号 P01308)。

[0099] 本发明使用的术语“胰岛素同功能变体”可以理解为在胰岛素序列中通过缺失、插入或突变至少一个氨基酸所得到的多肽,这些多肽基本能够维持与其所来自的胰岛素相同的特性。胰岛素活性测定的方法是本领域技术人员所熟知的,如血糖正常量箱位或测量血清中的糖基化蛋白(Bunn et al., Diabetes, 1981, 30 :613-617)。

[0100] 胰岛素的同功能变体包括但不限于:脱五肽(B26-B30)-Phe^{B25}- α -羧胺胰岛素, Asp^{B10}胰岛素(US4992417 中披露), Lys^{B28}-Pro^{B29}胰岛素 Lys^{B28}-Pro^{B29}, 及其六聚体变体(US5474978 和 US5514646 中披露),胰岛素和精蛋白剂型(US5650486),酰化 Lys^{B28}-Pro^{B29}胰

胰岛素 (US5922675), 稳定胰岛素的组合物, 如 US5952297、US6034054 和 US6211144 披露的, 胰岛素超活性类似物, 单体胰岛素, 肝脏特异性胰岛素, 赖脯人胰岛素 (Humalog®), 赖脯人胰岛素精蛋白制成的赖脯人胰岛素 (商标为 Humalog® 50/50™, Humalog® 75/25™), NPH 胰岛素或低精蛋白人胰岛素 (商标为 Humulin®), 普通胰岛素, NPH 胰岛素与普通胰岛素的结合 (US5547929), 锌胰岛素, 甘精胰岛素, 赖谷胰岛素 (APidra), 门冬胰岛素 (Novomix), 地特胰岛素 (levemir), biota, LP-100, novarapid 胰岛素, 锌胰岛素悬浮液 (缓慢或超慢), GLP-I (1-36) 酰胺, GLP-I (73-7) (US5614492 中披露的胰岛素调理素), LY-315902 (Lilly), GLP-I (7-36)-NH₂, AL-401 (自体免疫), 如 US4579730、US4849405、US4963526、US5642868、US5763396、US5824638、US5843866、US6153632、US6191105 和 WO 85/05029 所公开的组合物。

[0101] 此外, 胰岛素的同功能变体还包括与下述氨基酸序列具有至少 80% 氨基酸序列同一性的多肽: (a) 高脂肪饮食 A 链的 1 至 21 位残基与高脂肪饮食 B 链的 1 至 30 位残基的结合体, 或 (b) 其他特异性衍生于所述序列的片段。另外, 胰岛素序列中的由半胱氨酸残基 A6-A11、A7-B7 和 A20-B19 间的二硫键所维持的二级结构是胰岛素活性所必需的, 为此, 所述同功能变体优选保留尽可能多的这些二级结构。

[0102] 胰岛素的同功能变体还包括, 例如, 在胰岛素 N 端和 / 或 C 端插入或缺失一个或多个氨基酸的多肽, 也包括在胰岛素 A 链和 B 链的一个或多个内部区域中插入或缺失一个或多个氨基酸的多肽。正常来说, 胰岛素的多肽变体具有和高脂肪饮食 A 链的 1 至 21 位氨基酸残基与高脂肪饮食 B 链的 1 至 30 位残基的结合体几乎相同的氨基酸序列, 或者与特别衍生自所述氨基酸序列的片段具有至少 80%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列同一性。多肽变体的 A 链的序列长度至少为 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个残基, B 链至少 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、27、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 个残基。

[0103] 编码胰岛素的多聚核苷酸包括编码人类胰岛素及其前体 (前胰岛素原和胰岛素原) 的多聚核苷酸, 也包括编码其他物种的直系同源的多聚核苷酸。

[0104] “编码胰岛素同功能变体的多聚核苷酸” 是指编码上述活性胰岛素的多肽的核酸, 其与编码下述物质的核酸具有至少 80% 的同一性: (a) 上述高脂肪饮食 A 链的 1 至 21 位残基与上述人胰岛素多肽 B 链的 1 至 30 位残基的结合体, 或 (b) 编码特别衍生自上述氨基酸序列的其他片段的一个核酸, 其与具有所述序列的氨基酸序列具有至少 80%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。编码胰岛素变体的多聚核苷酸包括编码具有至少 45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、81、87、105 个核苷酸的胰岛素 A 链的核酸和 / 或编码具有至少至少 75、78、81、84、87、90、93、96、99、102、105、108、111、114、117、120、123、126、129、132、135 或 150 个核苷酸的胰岛素 B 链的核酸。

[0105] 所述多聚核苷酸单独存在或者作为载体的一部分存在。适合表达编码胰岛素或胰岛素同功能变体的多聚核苷酸的载体实质上 and 之前描述的与包含在 CT-1 中的组合物中有关的那些是一样的。

[0106] 可选地, 本发明中上下文使用的抗糖尿病化合物包括抗胰岛素血糖活性的化合

物或胰岛素活性的敏化剂,包括但不限于:胰岛素促分泌素,如磺酰脲类药物(甲苯磺丁脲、氯磺丙脲、格列甲脲、格列本脲、甲磺吡脲、格列太特、格列美脲、格列本脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格列美脲等等,以及 metiglinides(瑞格列奈、那格列奈、米格列奈等等)、肝脏葡萄糖产生的还原剂(双胍,特别是甲福明二甲双胍以及丁双胍),导致糖类下降的试剂,例如 α -葡(萄)糖苷酶抑制剂(阿卡波糖,米格列醇或伏格列波糖),增加葡萄糖外周应用的试剂,例如噻唑烷二酮类(罗格列酮,匹格列酮等等),GLP 或 GLP-1 模拟物(Byetta-艾塞那肽, Liraglutinide, CJC-1131(ConjuChem), 艾塞那肽-LAR(Amylin), BIM-51077, ZP-10, 如 WO 00/07617 中所描述的化合物,等等), exendin, 胰泌素, DPP-IV 抑制剂(西他列汀, 沙格列汀, 地那列汀, 维达列汀, ALS-2-0426, ARI-2243, BI-A, BI-B, SYR-322, MP-513, DP-893, RO-0730699 等等), SGLT-2 抑制剂(dapagliflozin 和 sergliflozin, AVE2268, T-1095 等等)和增加葡萄糖产生的多肽(安林肽、普兰林肽、exendin),具有 GLP-1 活性的化合物(胰高血糖素样肽 1),蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂 1B, 二肽基肽酶抑制剂,胰岛素促分泌素;脂肪酸氧化抑制剂, A2 拮抗剂, c-jun 末端激酶抑制剂, 胰岛素;胰岛素模拟物,糖原磷酸化酶抑制剂, VPAC2 受体拮抗剂, 葡糖激酶抑制剂等。

[0107] 本发明的组合物因为具有降血糖作用和增加肌肉葡萄糖捕获的能力而能够用于治疗代谢病(见实施例 2)。所述的组合物由于可以同时、单独或者顺序施用,可用于不同化合物的制备。因此,另一方面,本发明涉及治疗代谢病的组合物,其中所述组合物同时、单独或顺序施用。另一方面,本发明涉及本发明的组合物在用于制备治疗代谢病的药物的制备中的用途,其中所述组合物同时、单独或顺序施用。另一方面,本发明涉及一种治疗代谢病的方法,其包括同时、单独或顺序施用本发明的组合物。

[0108] 本发明组合物中的治疗室剂,CT-1 活性诱导剂和抗糖尿病试剂可以制备成单一剂型(如片剂或者胶囊,包括定量的每种组分),另一方面,也可以制备成单独的剂型,以便于后续组合以同时、顺序或单独施用。本发明的组合物还包括作为试剂盒部分的剂型,其中各成分独立配制,然后包装进同一容器中。本领域技术人员能够意识到本发明组合物的第一和第二组分是一样的,换句话说,一样的配制(片剂或者胶囊),这使得它们可以通过同样的方式施用。在本发明的不同组分被单独配制的情况下,两种组分可以同时在一个水泡中。每个水泡包含白天必需要消耗的药物。如果一天需要多次施用药物,那么对应于每次施用的药物可以放入水泡的不同部分中,优选在水泡的每个部分记录该天应当施用的时间。可选地,本发明组合物中的组分可以不同地配制,以便于不同组分可以不同地施用。因此,第一组分可被配制为用于口服的片剂或者胶囊,而第二组分可被配制为适用静脉注射的形式。

[0109] 本发明中组合物的施用方式是本领域技术人员所熟知的,包括,但不限于静脉注射、口服、鼻内给药、肠道用药、局部给药、经皮给药、直肠给药等方式。

[0110] 作为本发明组合物一部分的各组分的比例取决于在每种具体情况下使用的 CT-1 活性诱导剂和抗糖尿病试剂以及所需指示。因此,本发明的组合物两种组分的比例范围可以是 50 : 1 至 1 : 50,特别地,20 : 1 至 1 : 20,1 : 10 至 10 : 1 或者 5 : 1 至 1 : 5。

[0111] 能够使用本发明的组合物治疗的代谢病包括,但不限于,肥胖、胰岛素抵抗、高血糖症、异常脂血症和 2 型糖尿病,这些已在本发明的第一方面(CT-1 的治疗和美容用途)进行了描述。在另一实施方案中,本发明涉及一种治疗肥胖的美容方法,其包括向患者施用本

发明的组合物,其中所述候选患者进行的抗肥胖治疗纯粹出于美容目的,正如发明第一方面所述的那样(CT-1 的治疗和美容用途)。

[0112] 本发明下面通过具体实施例进行说明,以下的实施例仅仅是示例性的,在任何情况下都不限制本发明的范围。

具体实施例

[0113] 实施例 1

[0114] CT-1 对体重的影响

[0115] 通过摄入高脂肪饮食(HFD,60%脂肪)3个月,获得肥胖小鼠。连续6天静脉注射 rCT-1(0.2mg/kg/天)导致高脂肪饮食(HFD)的C57BL/6小鼠(5月龄)的体重下降(图1)。该实验中使用的剂量并没有引起发热反应(治疗中每天都测量直肠温度)。

[0116] 如图1所示HFD饲养并连续6天以前述0.2mg/kg/天剂量注射 rCT-1的肥胖小鼠观察到体重下降,这是因为该细胞因子的抑制食欲作用(图2)。该图示出了 rCT-1 处理组和生理血清静脉处理的对应对照组六天治疗内摄入的卡路里。

[0117] 同样,连续6天静脉注射 rCT-1(0.2mg/kg/天)同样引起正常饮食(NCD)饲养的非肥胖 C57BL/6 小鼠(5月龄)体重下降(图3)。该实验中所施用的剂量并没有引起发热反应(治疗中每天都测量直肠温度)。

[0118] 为了测定在使用所述剂量和之前提到的形式的 rCT-1 治疗中观察到的体重的下降是用于其抑制食欲的效果还是涉及其他效果,使用3组4月龄 C57BL/6 小鼠进行了研究。第一组小鼠(盐水组)用生理血清静脉注射(与 rCT-1 注射量一样),第二组(rCT-1 组)以之前所述的剂量(0.2mg/kg/天)静脉注射 rCT-1,第三组(成对饲养组)接受的每日食物量与 rCT-1 治疗的小鼠摄入的相同,并在相同的实验时间注射血清。如图4所示,尽管两组能量摄入的量都一样,但是用 rCT-1 治疗的小鼠比成对饲养组体重减少得更多,这表明除了先前观察到的抑制食欲的效果, rCT-1 还具有其他的能引起体重减少的生理效果。

[0119] 实施例 2

[0120] CT-1 降低血糖效果

[0121] 为了确定单剂量的 rCT-1(10 μ g)急性静脉注射到 C57BL/6 小鼠(3月龄)体内是否会降低血糖基准水平,用 rCT-1 和盐水血清治疗1小时后测定血糖水平。如图5A所示, rCT-1 显著地降低了血糖水平。血糖降低的机制并不是由于血液胰岛素水平的升高(如图5B所示),因为用 rCT-1 和盐水血清治疗的动物的胰岛素水平并没有显著性差异。结果以平均数 $\pm$ SE 表示。n = 5个动物每组, *p < 0.05。rCT-1 治疗导致肌肉中 AKT 磷酸化,该现象能解释了该细胞因子降低血糖的作用(图5C示出了代表性的 Western)。

[0122] 在高糖饮食后,急性施用单剂量(10 μ g)的 rCT-1 抑制血糖升高。为了研究 rCT-1 对于进食后血糖的影响,利用小鼠(C57BL/6,3月龄)进行了如下实验:通过胃管饲法使小鼠摄入高糖饮食(1%体重),该方法依据 Fruebis 等公开的(Fruebis et al.,2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,98:2005-2010)。在管饲之后,分别注射相同量的盐水血清或 rCT-1(10 μ g)。在图示的时间点取血,并测量血糖浓度,观察到在用 rCT-1 治疗的小鼠中血糖并没有发生增高(图6)。

[0123] 接着,测定了降低小鼠(C57BL/6,3月龄)血糖水平的单剂量的 rCT-1 急性注射是

否能够降低由于用链脲霉素治疗的 β 胰腺细胞损伤所带来的高血糖。因此,施用单剂量的链脲菌素 (200mg/kg) 64 小时后,测量基准血糖,并且对 3 组小鼠进行不同的治疗。第一组 (盐水组) 用盐水血清进行处理,第二组 (胰岛素组) 用 0.75U/kg 胰岛素进行处理,第三组 (rCT-1 组) 用 10 μ g 的 rCT-1 进行处理,第四组 (胰岛素 +rCT-1 组) 用 0.75U/kg 胰岛素和 10 μ g 的 rCT-1 进行处理。进行不同的处理后,于第 15、30、60 和 120 分钟测量血糖。如图 7 所示,在施用后 30 分钟,rCT-1 显著地降低了血糖,并且在所有分析的学提取点都增强胰岛素效果。

[0124] 为了确定急性 rCT-1 处理的降低血糖效果是否是由于肌肉葡萄糖捕获的升高所导致,在不同组的小鼠中通过 γ 计数器测量 18FDG (18 氟脱氧葡萄糖) 的肌肉捕获。为了完成该实验,小鼠 (C57BL/6, 3 月龄) 被分成以下四组:盐水组 (用盐水血清处理),胰岛素组 (0.75U/kg 胰岛素处理),rCT-1 组 (10 μ g 的 rCT-1 处理) 和胰岛素 +rCT-1 组 (0.75U/kg 胰岛素 +10 μ g 的 rCT-1 处理)。不同处理进行 15 分钟后,加入 18FDG,并在注射 10 分钟后提取腓肠肌,用 γ 计数器来定量释放的放射性。结果 (图 8) 示出了 rCT-1 可能增加了肌肉的葡萄糖消耗并且能增强 (虽然与观察到的那些相比并不显著) 胰岛素。

[0125] 接着,在具有通过 3 个月摄入高脂肪饮食 (HFD, 60% 脂肪) 诱导的肥胖的 C57BL/6 小鼠 (5 月龄) 体内测定慢性 rCT-1 处理的血糖降低和胰岛素降低的效果。在饮食处理的最后,连续 6 天静脉注射 rCT-1 (0.2mg/kg/天) 处理小鼠 (慢性处理)。如图 9 所示,在用 rCT-1 处理后血糖浓度水平 (上图) 和胰岛素水平 (下图) 出现了显著的下降。

[0126] 接着,对比了 rCT-1 慢性处理组和对应的成对饲养 (PF) 组对于降低血糖和降低胰岛素的效果。rCT-1 组小鼠:用前述剂量 (0.2mg/kg/天) 静脉注射小鼠,连续 6 天;成对饲养组小鼠:日摄食量与 rCT-1 处理组小鼠一样,并在相同的实验时间注射血清。如图 10 所示,和接受相同卡路里限制的相比,rCT-1 慢性处理的动物的血糖出现了显著的降低 (上图),这表明降血糖效果并不只是由于 rCT-1 诱导的抑制食欲的作用,似乎还由于蛋白本身的降血糖性质。

[0127] 然后,测定 rCT-1 (0-100ng/mL) 的体外处理是否能够抑制肠环内的糖转运。因此,37°C 下,存在或不存在 r-CT-1 时,将空肠环外翻培育 15 分钟,通过测量 α -甲基葡萄糖苷 (1mM) 的捕获确定葡萄糖的肠道内转运。 α -甲基葡萄糖苷是葡萄糖的类似物,其仅通过 SGLT1 钠-糖共转运载体穿过肠上皮细胞的顶膜,这意味着它们转运的变化应归因于所示转运载体的活性变化。图 11 示出了 CT-1 能够在肠内抑制葡萄糖的吸收,然而观察到该效果并不依赖于剂量。

[0128] 接着,测定了 CT-1 和 CNTF 对于肠环中 α -甲基葡萄糖苷 (1mM) 的作用。根据图 11 中描述的实验方法,观察到 CT-1 对于葡萄糖肠转运的抑制作用要高于 CNTF (在当前实验条件下并没有达到显著性差异)。

[0129] 接着,测定 CT-1 对于葡萄糖的肠捕获的体外效果是否可以在体内复制。为了完成该实验,向 C57BL/6 (2 月龄) 小鼠急性静脉注射 rCT-1 (10 μ g)。观察到施用 CT-1 抑制了 α -甲基葡萄糖苷 (1mM) 的肠转运 (图 13)。在施用 CT-1 后 3 小时同时分离肠环和转运 α -甲基葡萄糖苷 (1mM)。所得到的结果表明,当系统地向动物体内施用 CT-1 时,CT-1 能够抑制肠内葡萄糖的转运,并且能够加强前面体外进行的显示出了 rCT-1 抑制肠道葡萄糖转运的能力的实验。

[0130] 稍后又测定了连续 6 天（慢性治疗）向 C57BL/6(5 月龄) 小鼠静脉注射 rCT-1(0.2mg/kg/天) 是否能抑制肠环中 α -甲基葡萄糖苷(1mM) 的肠吸收, 并与用盐水血清处理的小鼠进行了对比。结果在图 14 中示出, 其中, 可以看出, rCT-1 如何抑制肠葡萄糖转运（体内缓慢治疗）。

[0131] 接着, 通过 CACO-2 人类细胞系的细胞, 测定了 rCT-1 对 α -甲基葡萄糖苷(0.1mM) 捕获的效果。结果（图 15）表明, rCT-1 处理导致 CACO-2 人类细胞系中 α -甲基葡萄糖苷(0.1mM) 捕获的浓度依赖型抑制效果, 该细胞系和人类肠上皮细胞具有相同的功能。从上边缘用 CT-1 处理 1 小时（图 15A）和 24 小时（图 15B）, 观察到在 20ng/ml 剂量时, 研究的两个预孵育时间点上差异很显著。结果表示为每组 42-44 个测定值的平均值 $\pm$ SE。

[0132] 实施例 3

[0133] CT-1 和 CNTF 的不同效果

[0134] 图 16 示出了在大鼠脂肪细胞初级培养物中进行的实验结果, 该实验为了确定 rCT-1 和 CNTF 调节脂肪细胞瘦素分泌的能力。图 16A 示出了 rCT-1 治疗(72 小时) 能够抑制瘦素的基准分泌和胰岛素刺激的分泌(1.6nM)。然而, 相同浓度的 CNTF 并没有观测到这些效果（图 16B）。

[0135] 图 17 示出了在大鼠脂肪细胞初级培养物中进行的实验结果, 该实验为了确定在存在或不存在胰岛素的情况下, CT-1 和 CNTF 调节脂解的能力。该图表明, CT-1 能够诱导甘油的释放（脂解测量）并且抑制胰岛素的抗脂解活性, 而 CNTF 不能。这些数据表明, CT-1 能够移动脂肪, 并且正如之前所展示的, 提高肌肉中的 β 氧化作用, 这表明该细胞因子能够减少脂肪堆积。

[0136] 另外, 重要的是, CT-1 能够诱导脂肪细胞中棕色脂肪组织的典型基因（如 II 型脱碘酶碘甲腺原氨酸, Dio-2 和非耦联蛋白 -1, UCP-1）, 而 CNTF 却没有这个功能（图 18）。一些研究表明, 旨在诱导白色脂肪组织中棕色脂肪组织典型基因的治疗方法能够有效地改善与肥胖有关的病症 (Farmer S. Genes Dev. 2008 ;22 :1269-7)。

[0137] 实施例 4

[0138] 缓慢施用 CT-1 不会引起炎症反应

[0139] 为了测定 CT-1 缓慢施用之后引起炎症的能力, 检测 C57BL/6 小鼠(5 月龄) 的 IL-6 血清水平, 所述小鼠通过连续 3 个月摄入高脂肪饮食(HFD, 60% 脂肪) 而变得肥胖。在饮食处理结束时, 连续 6 天（缓慢治疗）向小鼠静脉注射 rCT-1(0.2mg/kg/天)。结果（图 19）显示用所述剂量缓慢处理并没有引起炎症反应（在器官如肝脏和肌肉中组织学地确认数据）。

[0140] 另外, 对肝脏进行组织切片, 以使用显微镜检测炎症症状的存在。结果（图 20）示出了 3 组小鼠(C57BL/6, 4 月龄) 肝脏组织切片的图片(H&E100X): 对照组: 静脉注射生理血清（注射量和 rCT-1 一样）; rCT-1 组: 连续 6 天以前述的剂量(0.2mg/kg/天) 向小鼠静脉注射 rCT-1; 成对饲养组: 与 rCT-1 组小鼠的食物日摄入量相同, 并且在相同的实验时间注射血清。正如图中观察到的, 三组小鼠中都没有观察到任何的炎症浸透, 也没有观测到其他任何的显著形态学变化。

[0141] 实施例 5

[0142] CT-1 对于脂类代谢的效果

[0143] 为了测定 CT-1 对脂类代谢的可能作用,缓慢施用 rCT-16 天后,对经过 3 个月的高脂肪饮食诱导产生的肥胖小鼠,测定不同的血清脂质的水平。结果表 1 中列出

[0144] HFD 的肥胖小鼠

	载体 (n= 7)	CT-1 (n=7)
总胆固醇(mg/dl)	314.8±22.30	186.6±7.8***
LDL-胆固醇(mg/dl)	193.4 ±21.6	93.7 ± 4.7***
[0145] 总胆固醇/ HDL-胆固醇的比例	3.22 ± 0.35	2.41 ± 0.06*
甘油三酯 (mg/dl)	99.9±10.26	76.8 ± 7.63*
游离脂肪酸 (mmol/l)	1.87 ± 0.11	0.80 0.03
葡萄糖 (mg/dl)	212.4 ± 26.54	138.6 ± 17.27*
胰岛素 (ng/ml)	2.08 ± 0.76	1.01 ± 0.24*

[0146] 表 1 :进行 3 个月的高脂肪饮食诱导以产生肥胖小鼠 (HFD),对它们进行连续 6 天的 rCT-1 缓慢治疗 *P < 0.05, ***P < 0.001

[0147] 此外,在野生型小鼠进行高脂肪饮食后,测定血清中脂肪酸和甘油三酯的水平。为此,使用了两组动物 (n = 5),在实验前禁食 3 小时。接着,用高脂肪食物对两组动物进行管饲养 (1%体重),获得血样以测定基线水平。进食之后,通过静脉注射施用血清 (▲) 或 rCT-1 (10 μg/ml) (Δ)。结果 (图 21) 示出了用 rCT-1 处理导致了游离脂肪酸水平 (2-5 小时后, *P < 0.05) (上图) 和甘油三酯水平 (1-3 小时后, *P < 0.05) (下图) 显著地降低。

[0148] 接着研究了脂肪乳剂注射后,用 rCT-1 处理是否会加快血清中游离脂肪酸的清除。为此,在脂肪乳剂注射后 30 分钟,向两组动物 (n = 5) 静脉注射 rCT-1。向对照组动物注射盐水。5 分钟后测定血清中的游离脂肪酸浓度。接着,用注射脂肪乳剂 5 分钟后的 FFA 值 (100%) 来标准化在不同时间点测量得到的游离脂肪酸清除值。如图 22 中所示,FFA 的丧志症动力学在用盐水处理的小鼠和用 CT-1 处理的小鼠间有显著差异 (通过双因素方差分析及邦费罗尼事后分析获得的 P < 0.05)。

[0149] 为了测定 rCT-1 对于 β 氧化的可能的影响,分别对盐水处理和 CT-1 处理 (10 μg 1 小时) 的小鼠中分离的腓肠肌中的棕榈酸酯的氧化进行测定。结果 (图 23) 显示用 rCT-1 急性处理导致骨骼肌中脂肪酸氧化的增高。此外,用 RT-PCR 来测定肌肉中涉及脂肪酸氧化的基因表达水平,响应 rCT-1 急性处理 (3 小时)。结果 (图 24) 显示了 rCT-1 引起了 PGC-1b、CPT-1、ACD、ACO 和 MCDA 基因的 mRNA 水平的升高。测定每个转录本所需要的循环数与作为内参的亲环蛋白所需要的数量进行比较,同设定为 1 的盐水处理的动物的值 (n = 5-6, *P < 0.05) 相比,它可表示为任意单位。

[0150] 实施例 6

[0151] CT-1 在骨骼肌中对胰岛素作用的增强效果

[0152] 骨骼肌是对胰岛素作用最敏感的组织,在胰岛素刺激下能提供健康个体体内 90% 的葡萄糖摄取。发明人发现 CT-1 能够在体外和体内增强肌肉中的胰岛素信号发送。

[0153] “体外”实验是用 rCT-1 急性 (1 小时) 或缓慢 (24 小时) 处理后,通过测定大鼠肌管中 (L6E9 成肌细胞分化成肌管) 胰岛素诱导的 2-脱氧葡萄糖的摄取和 AKT 磷酸化来进行的。观察到 CT-1 刺激胰岛素诱导的 2-脱氧葡萄糖摄取 (图 25) 和胰岛素激活的 AKT 磷酸化 (图 26)。这些数据表明,CT-1 增强了胰岛素在肌肉中的作用。这些数据与那些相同家族的细胞因子,IL-6 的数据不同 (Nieto-Vazquez, I. 等, Diabetes 2008, 57 :3211-3221)。

[0154] 此外,还观察到,在体内,在胰岛素刺激 (0.5U/ 小鼠,下静脉注射) 之前 30 分钟静脉注射 rCT-1 (10 μ g/ 小鼠) 导致肌肉中胰岛素诱导的 AKT 磷酸化作用提高 (图 27)。此外,和那些与 CT-1 处理的具有相同的摄入且注射盐水血清的动物相比 (成对饲养组) (图 28),连续 6 天以 0.2mg/kg/ 天的剂量对小鼠进行 rCT-1 慢性处理也增强了肌肉组织中胰岛素的效果。所有这些数据都表明在骨骼肌中在胰岛素存在下 CT-1 的刺激作用。

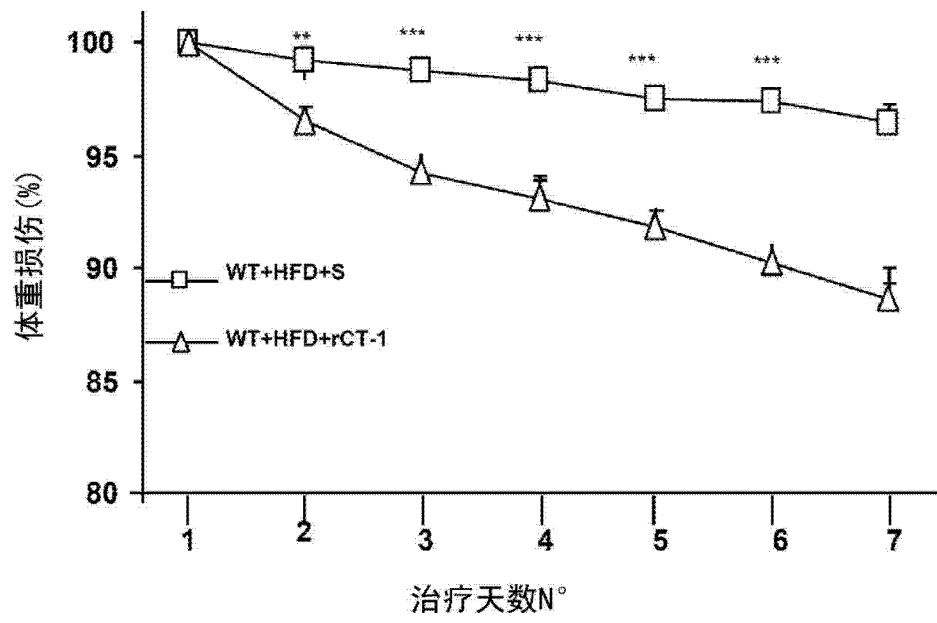


图 1

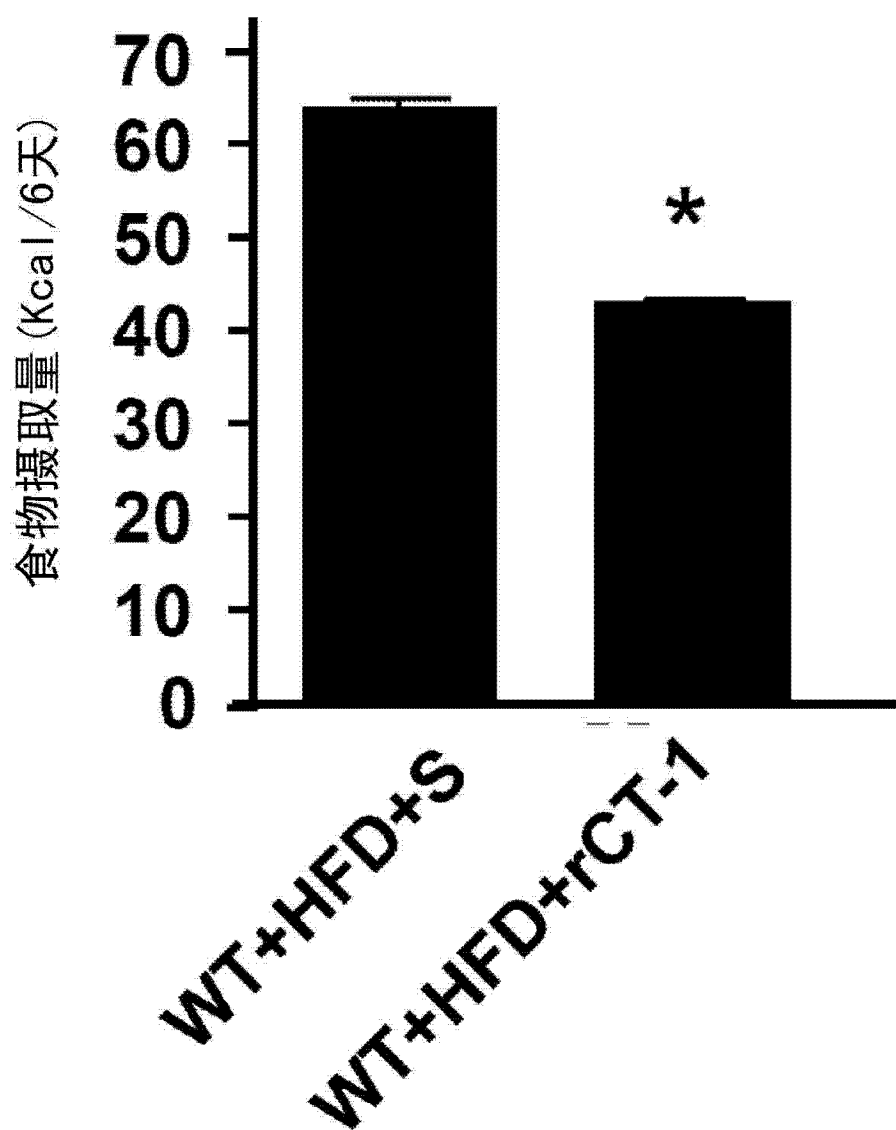


图 2

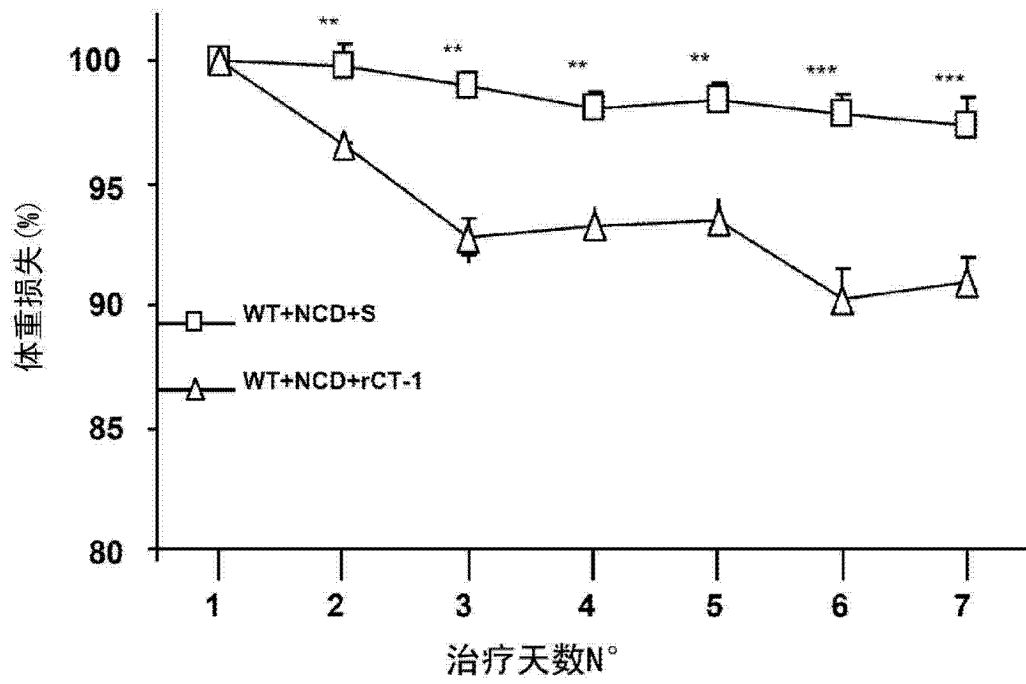


图 3

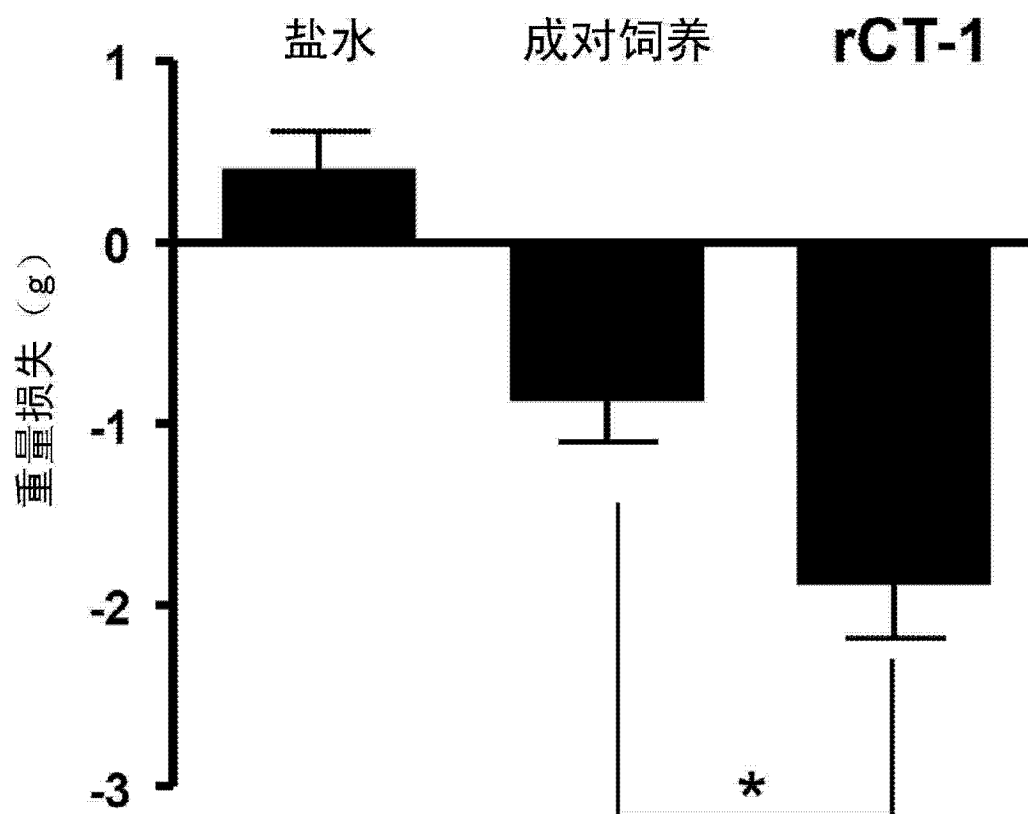


图 4

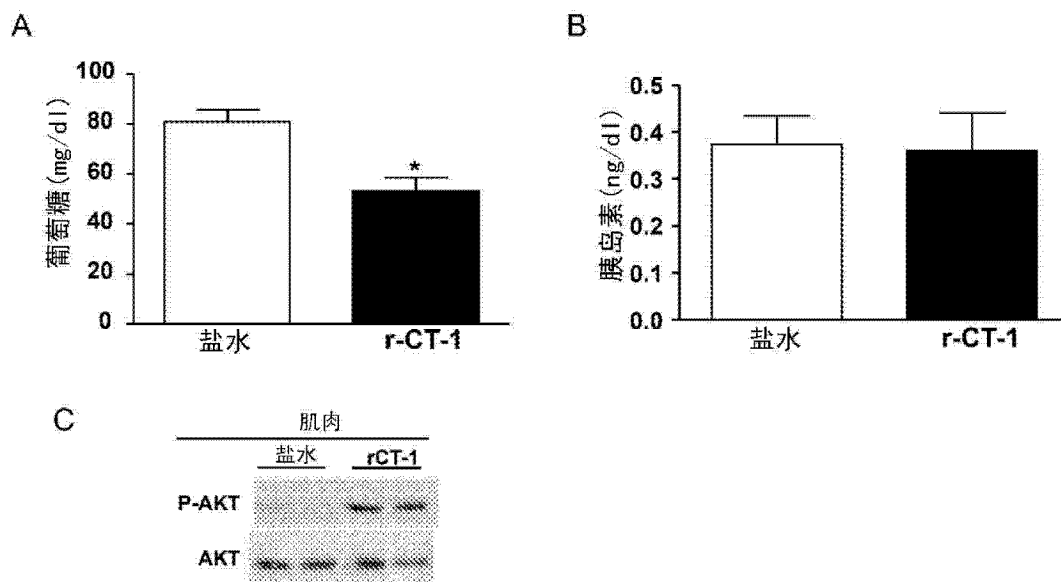


图 5

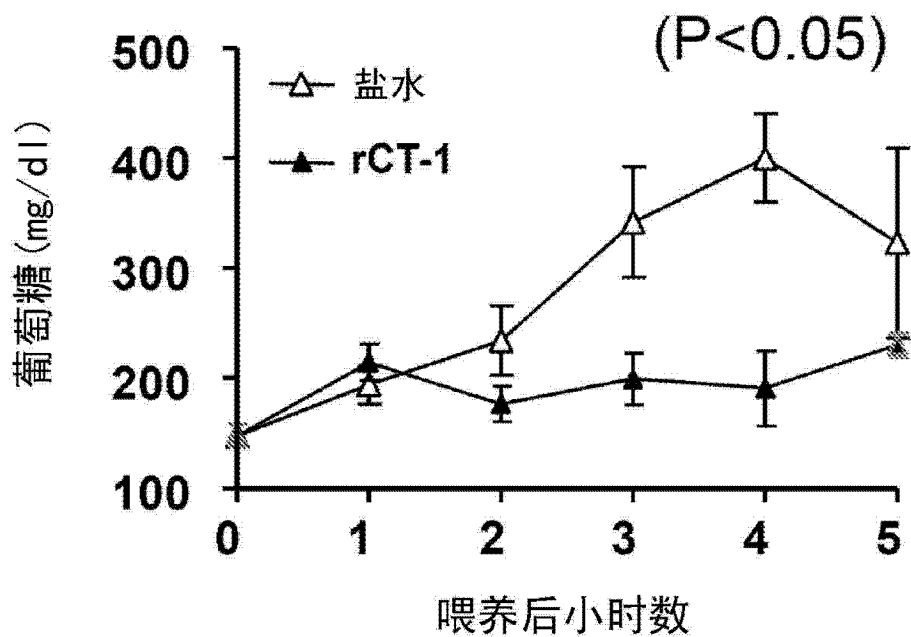


图 6

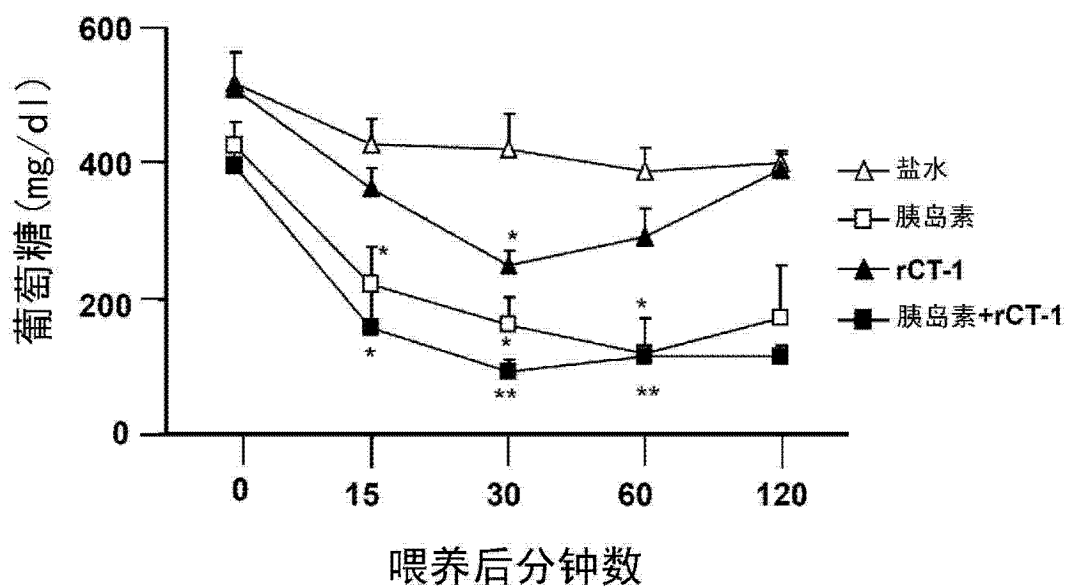


图 7

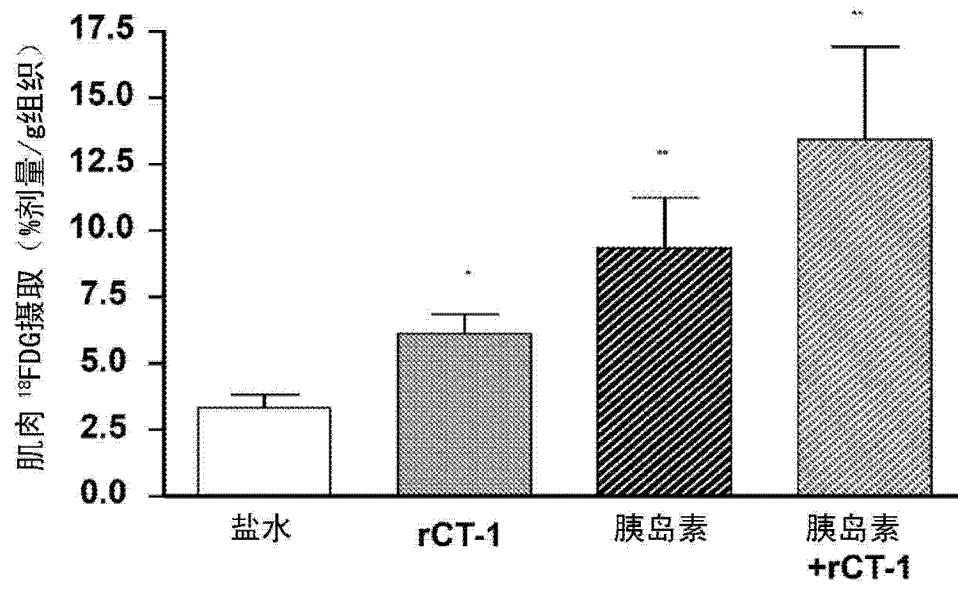


图 8

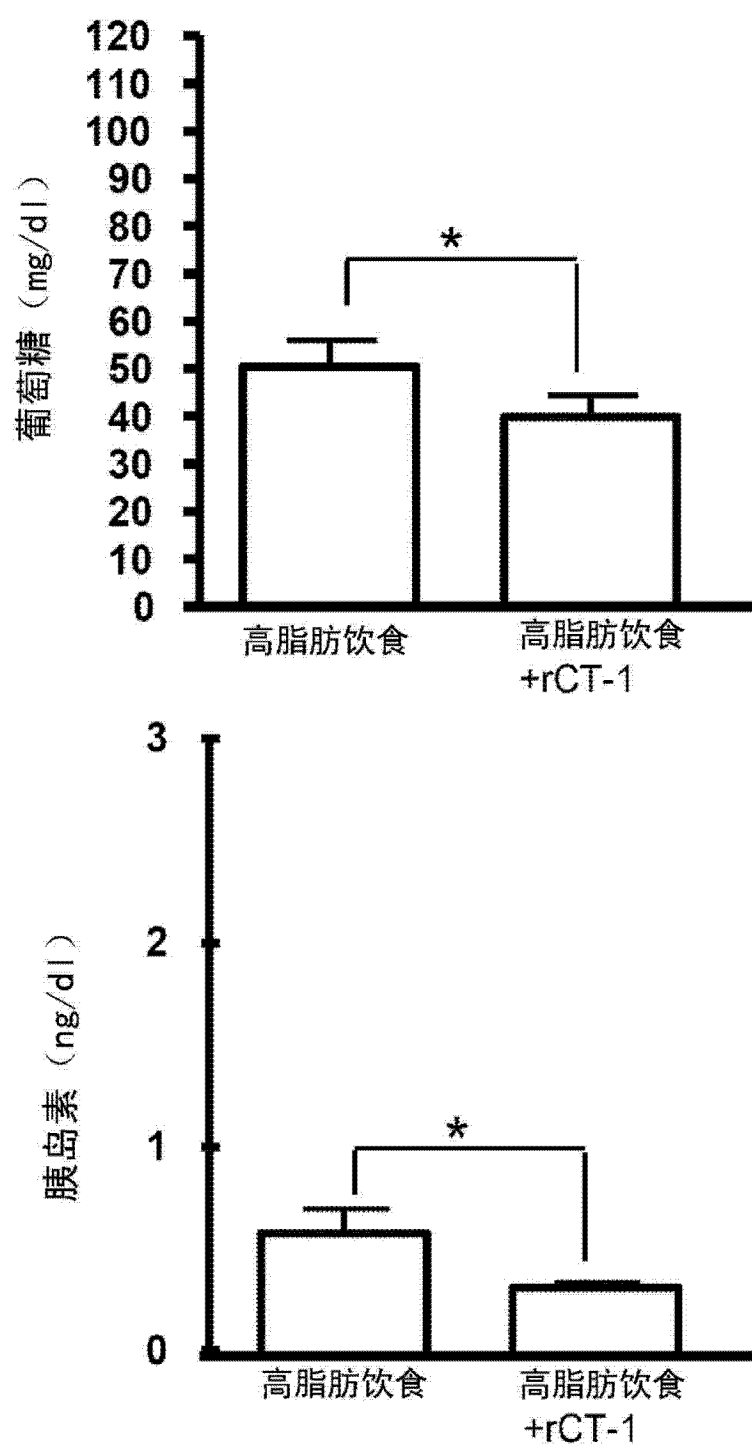


图 9

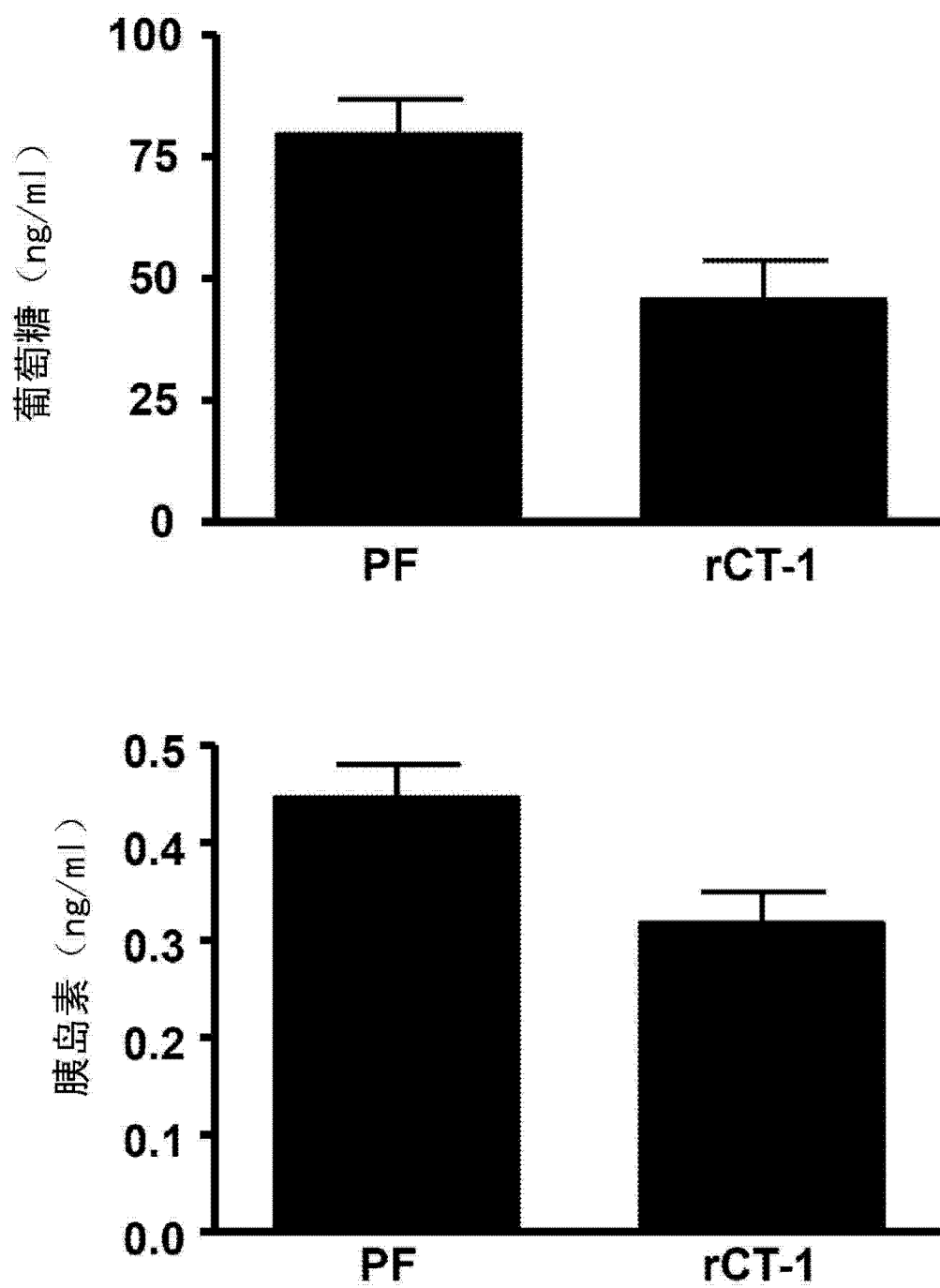


图 10

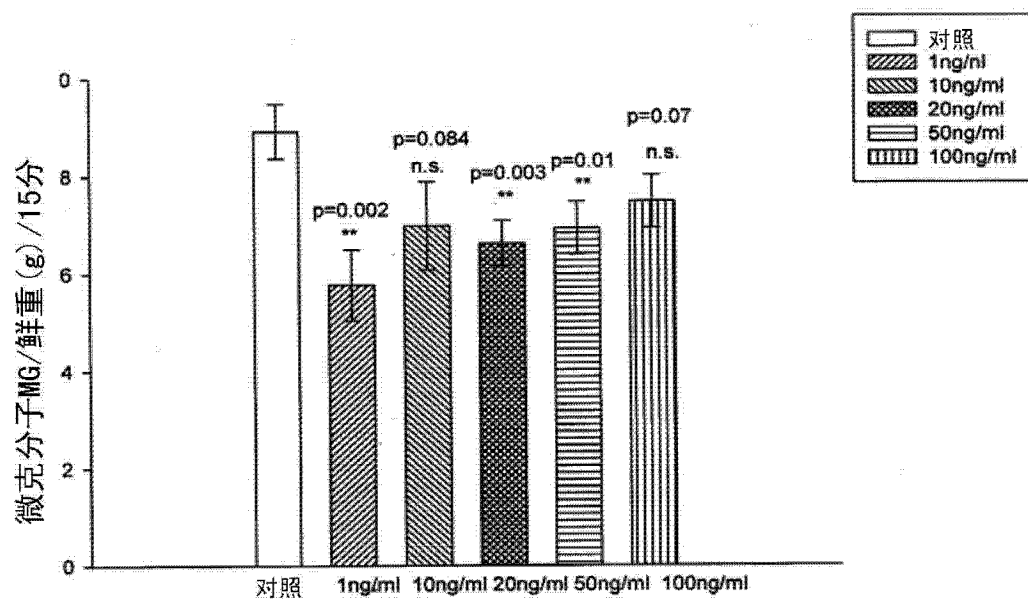


图 11

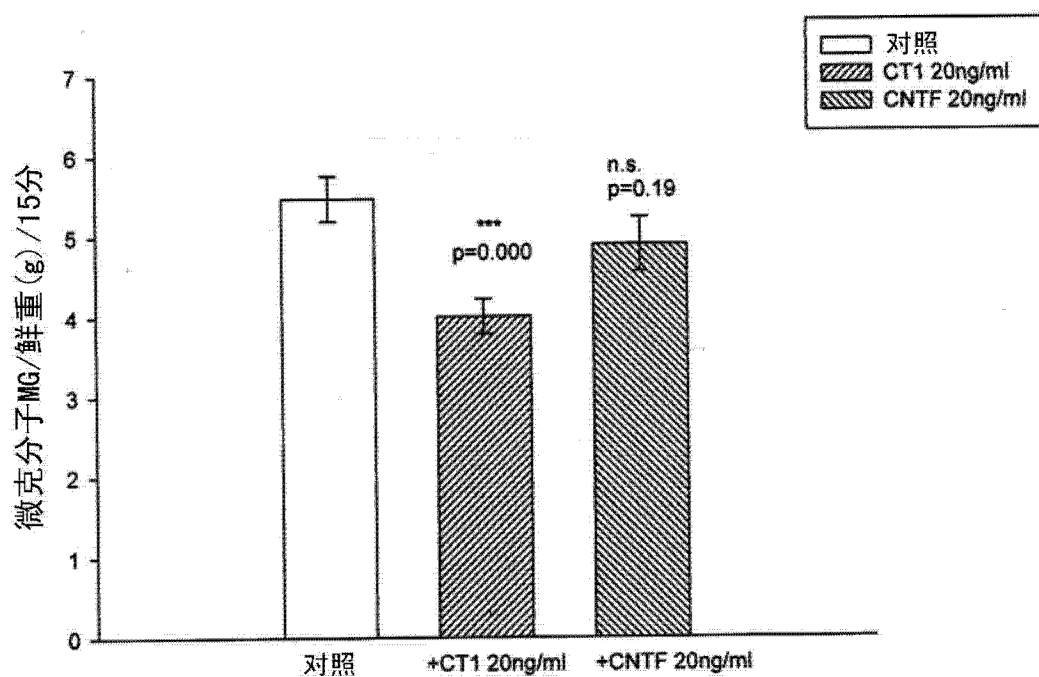


图 12

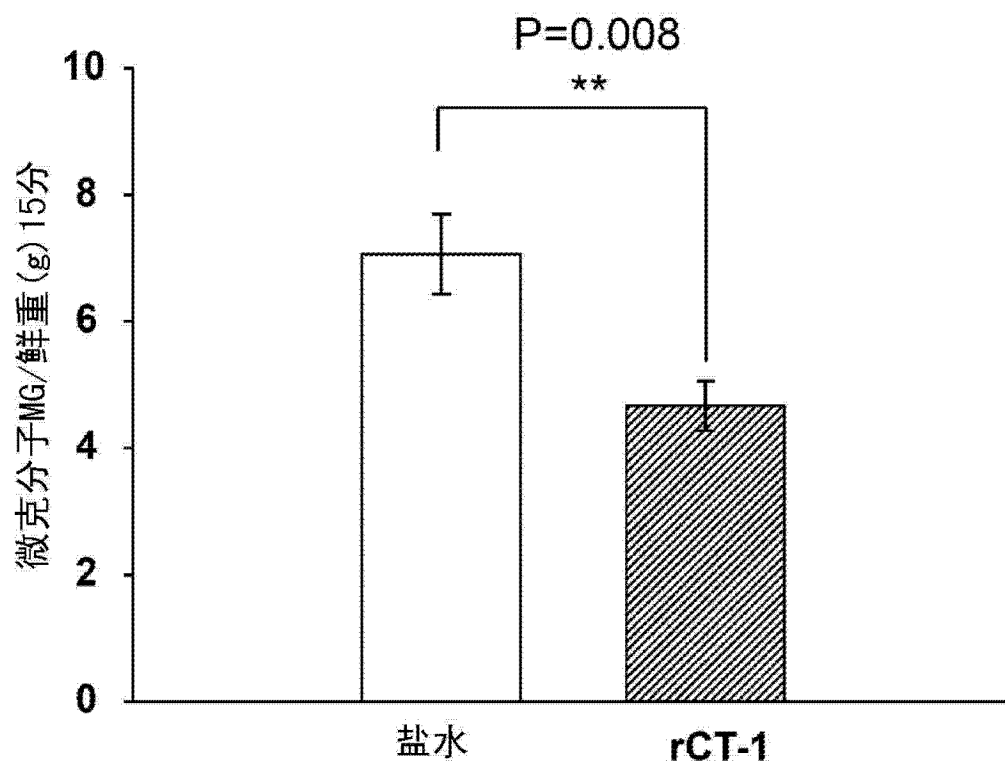


图 13

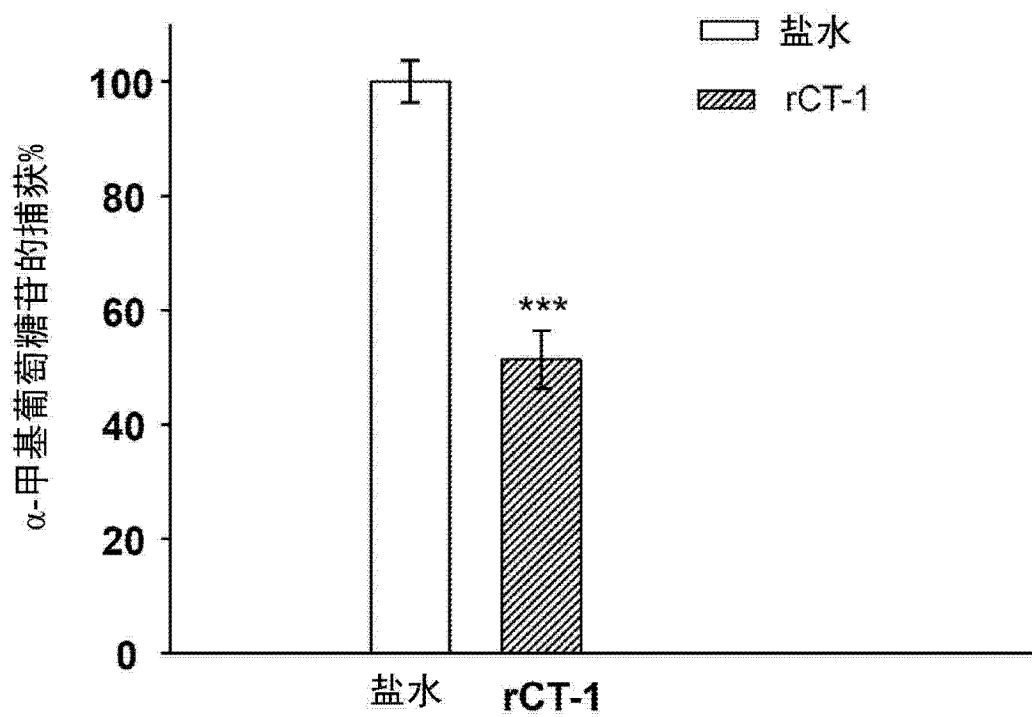


图 14

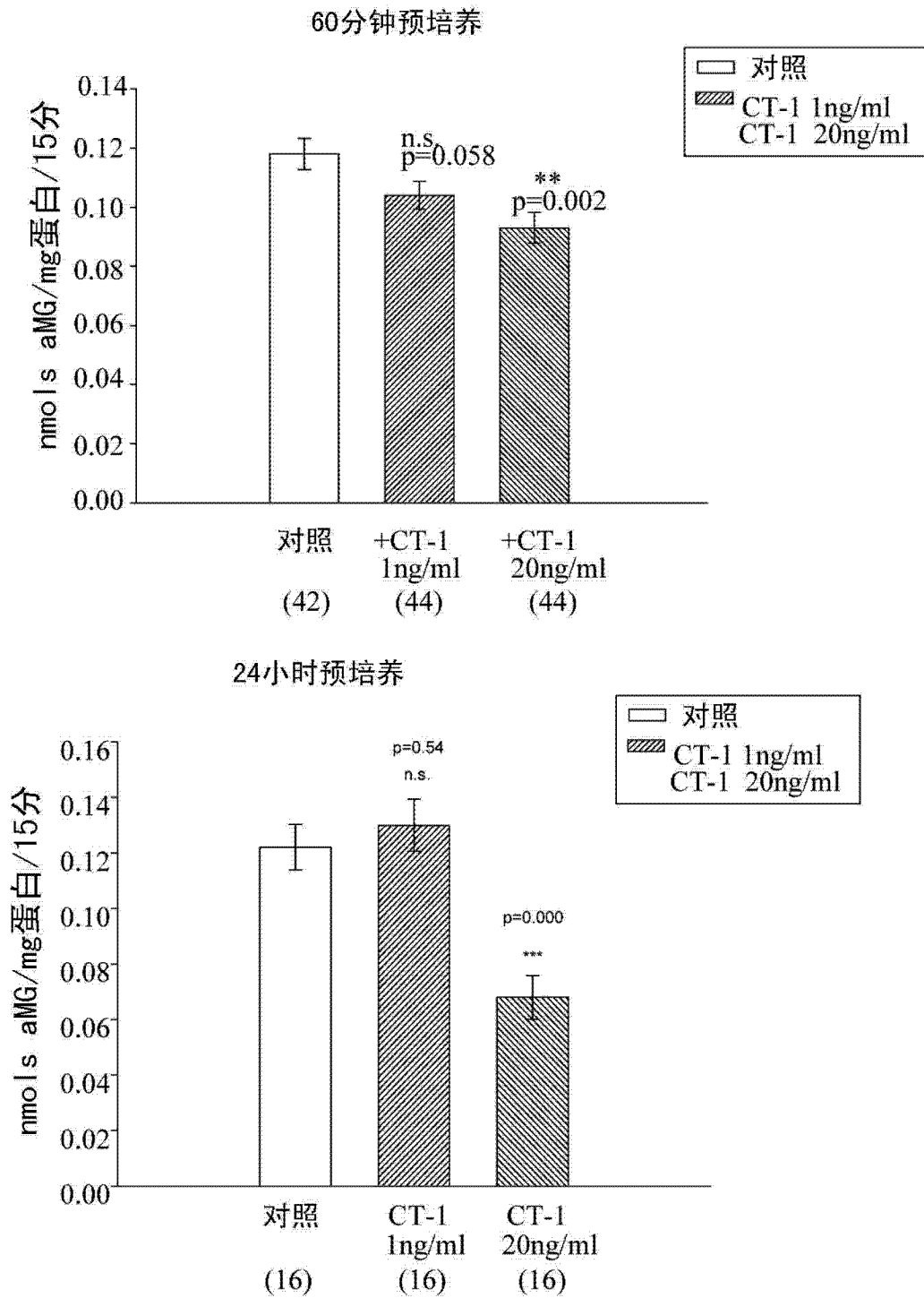


图 15

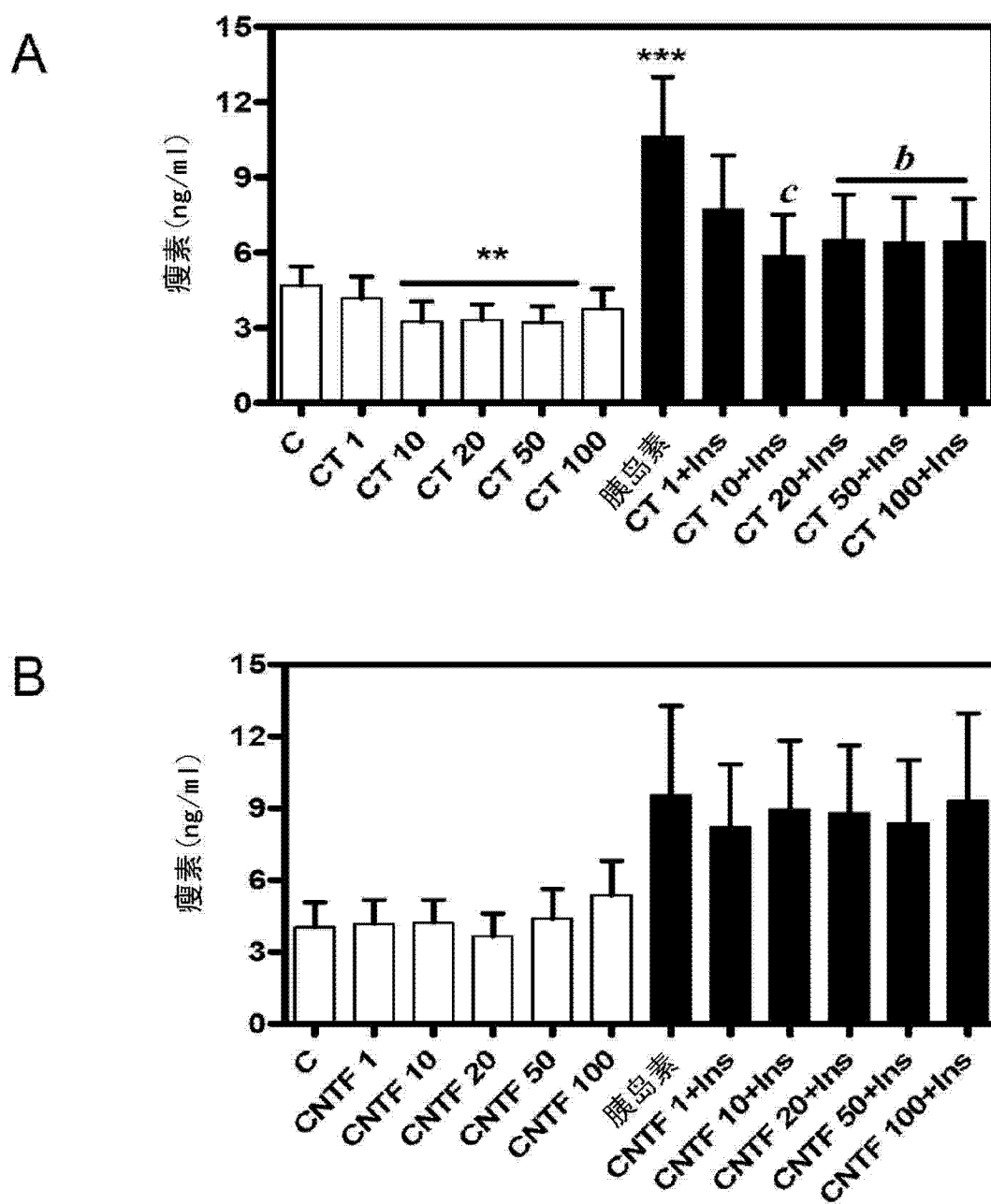


图 16

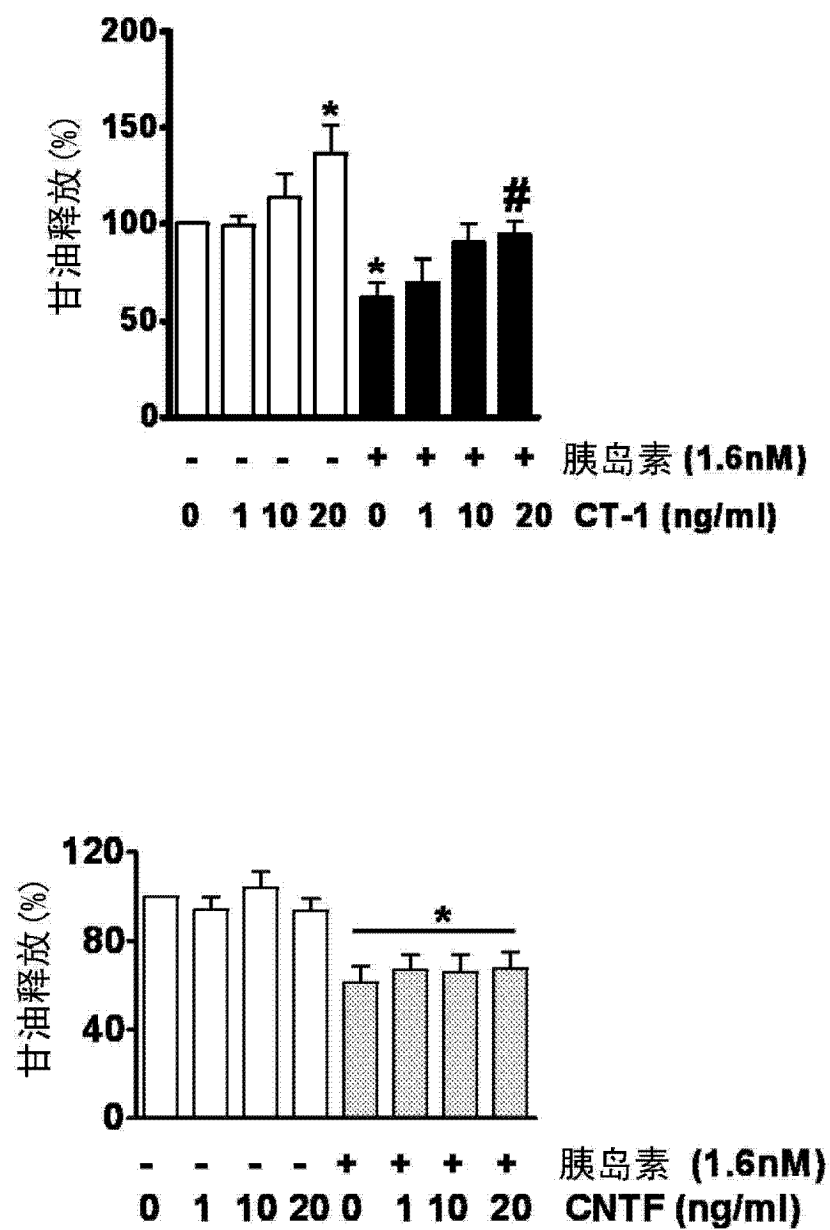


图 17

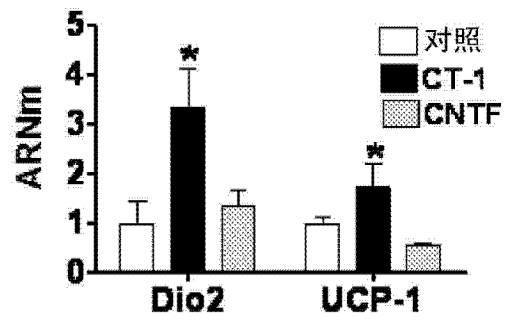


图 18

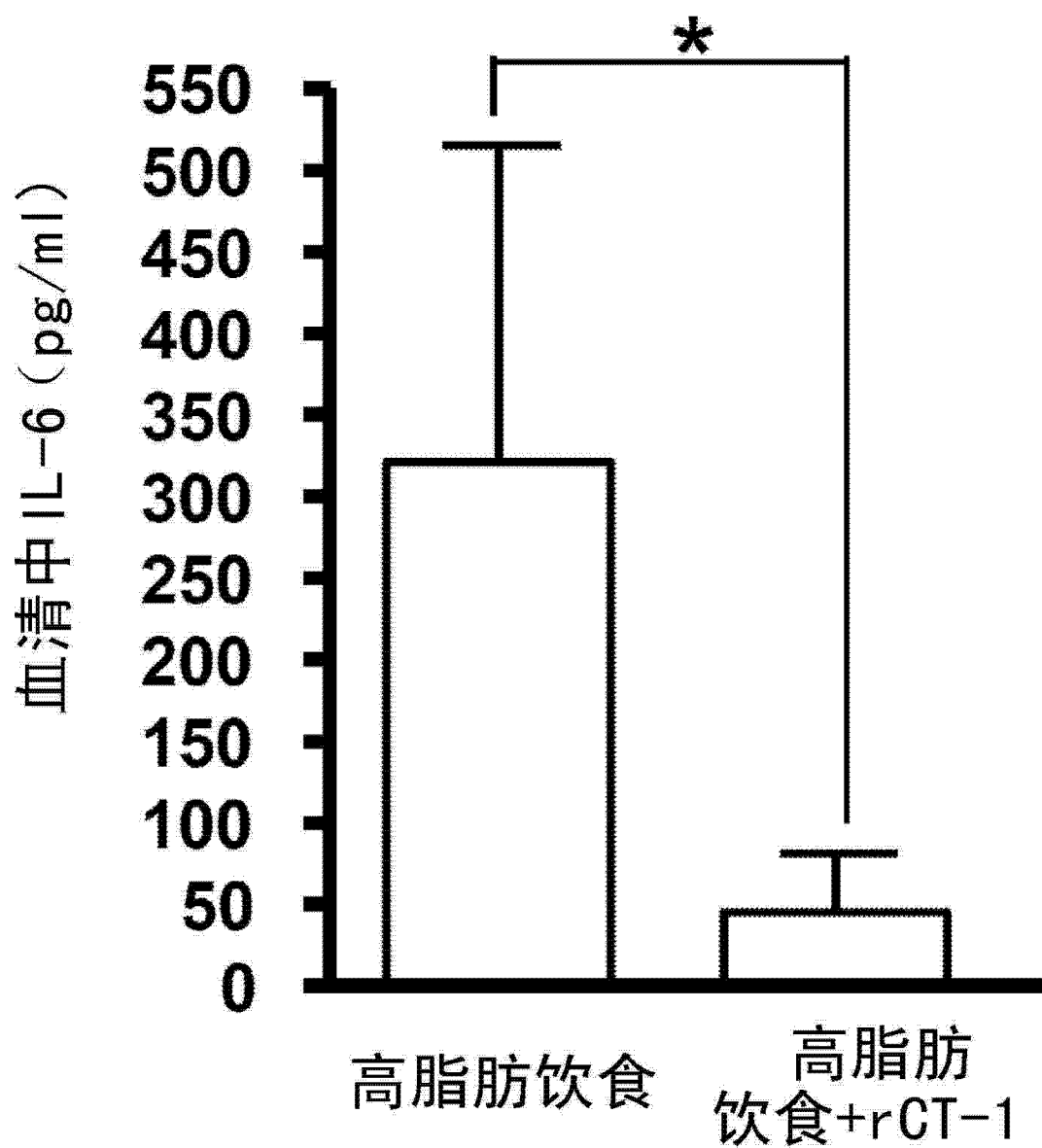


图 19

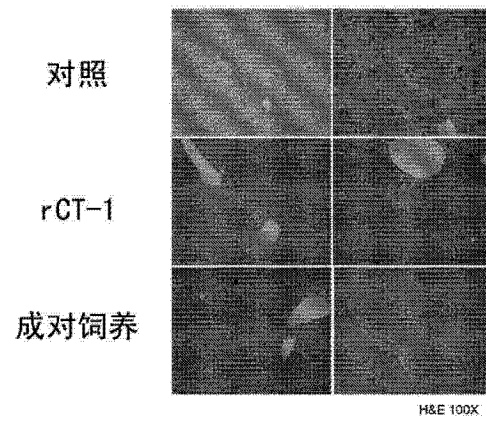


图 20

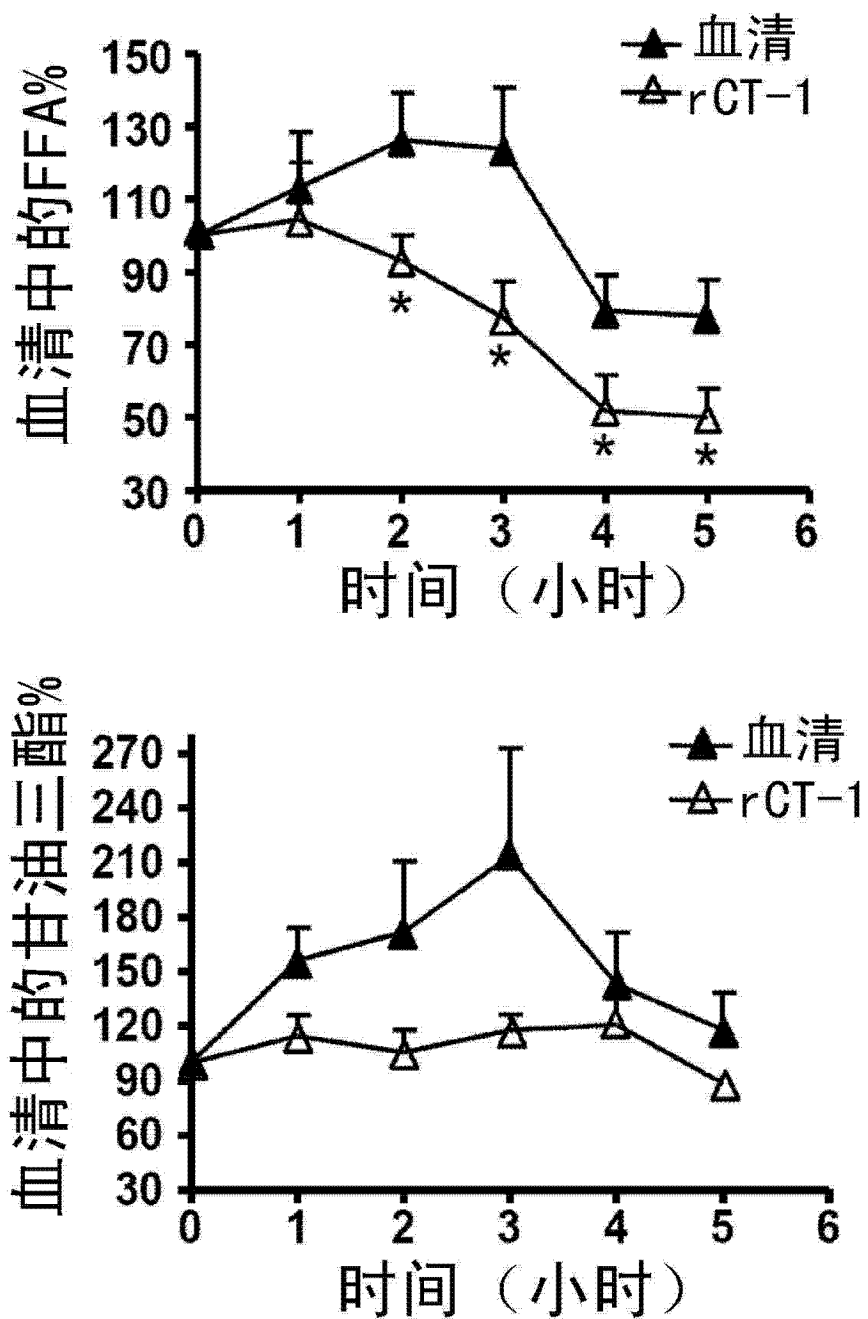


图 21

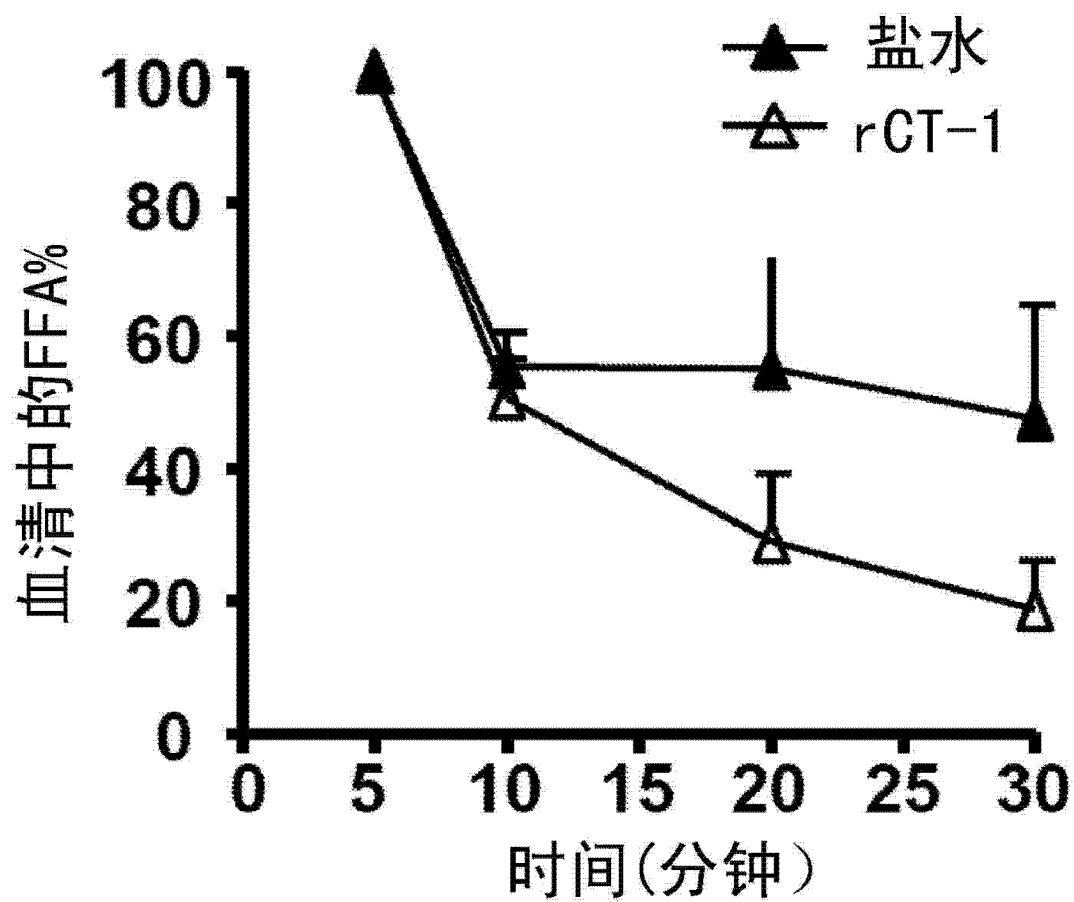


图 22

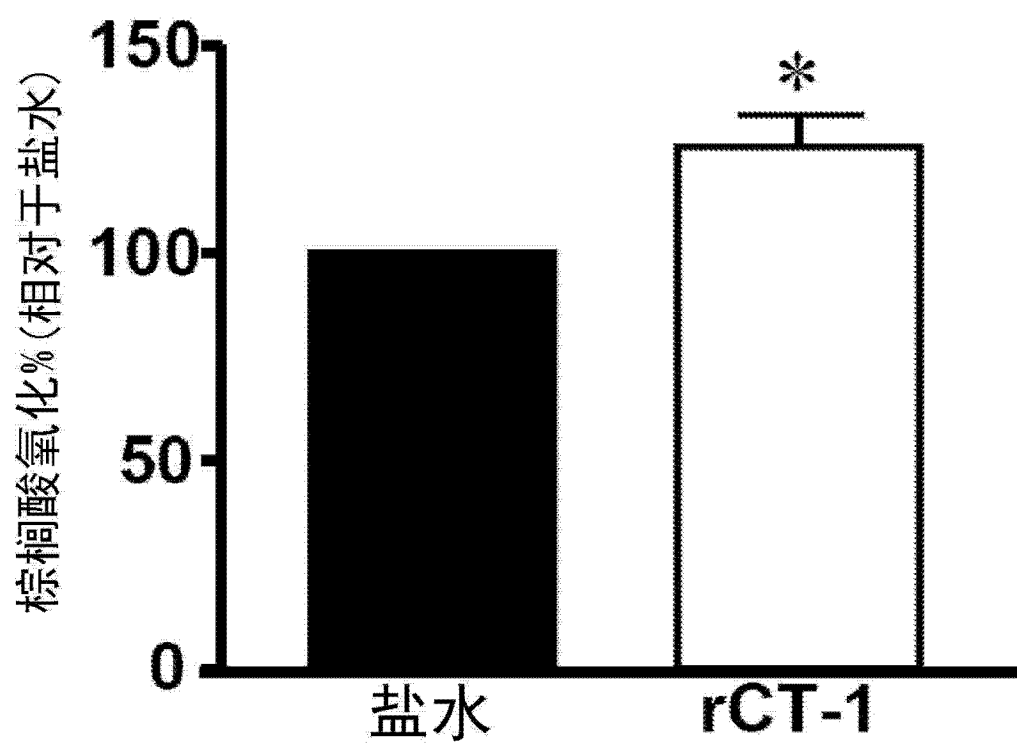


图 23

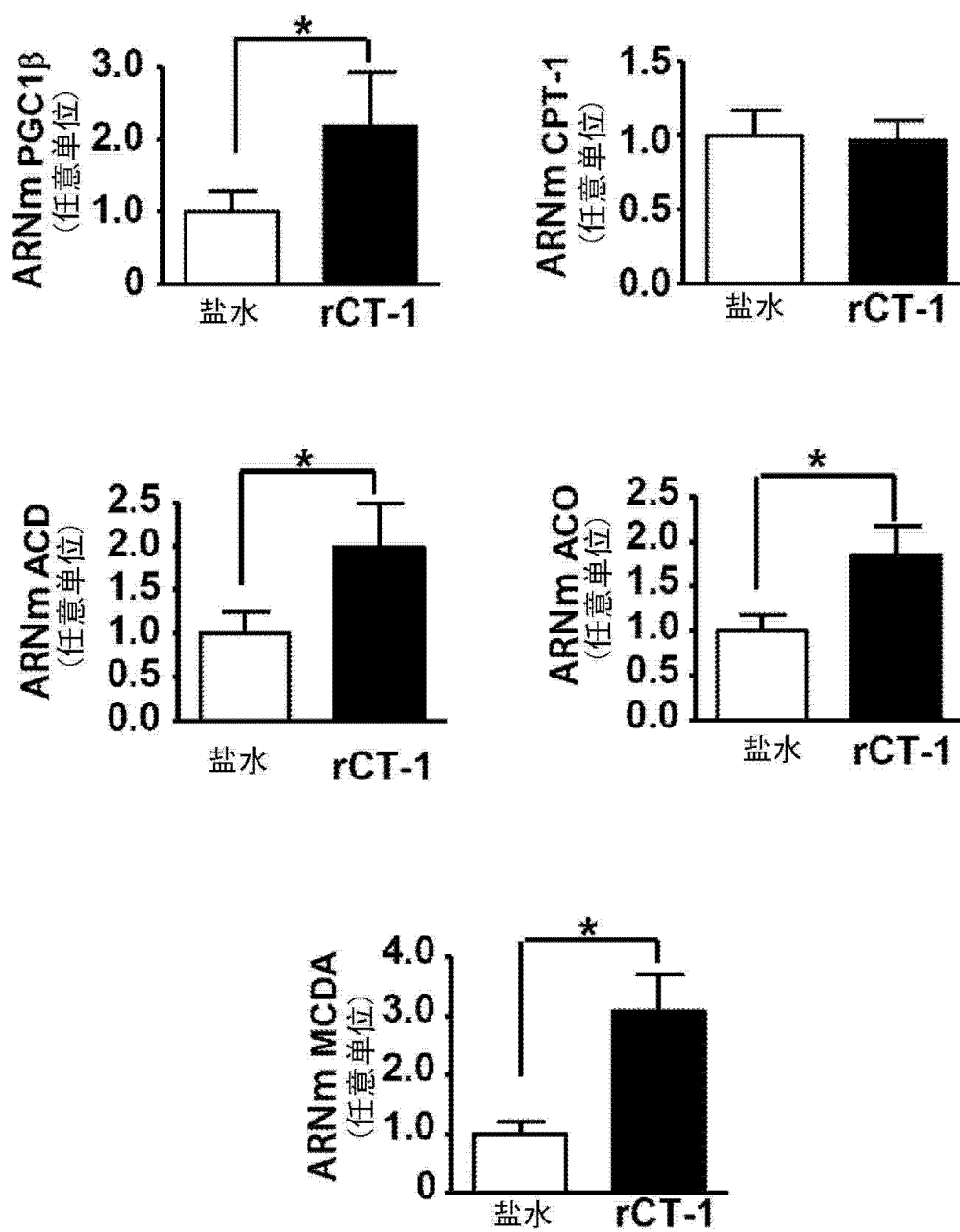


图 24

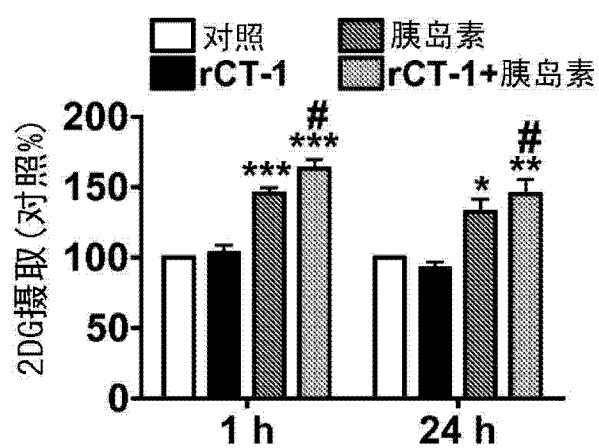


图 25

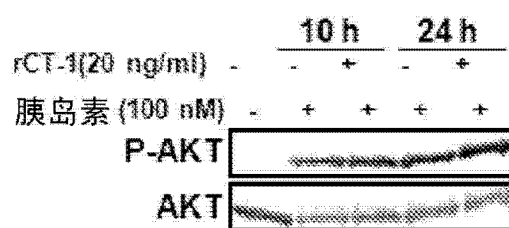
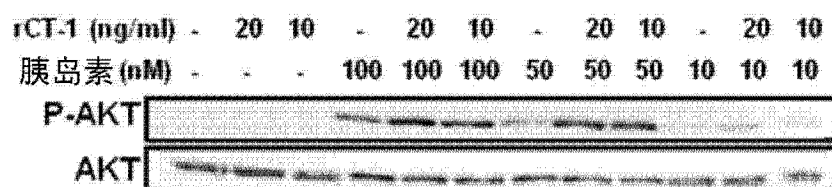


图 26

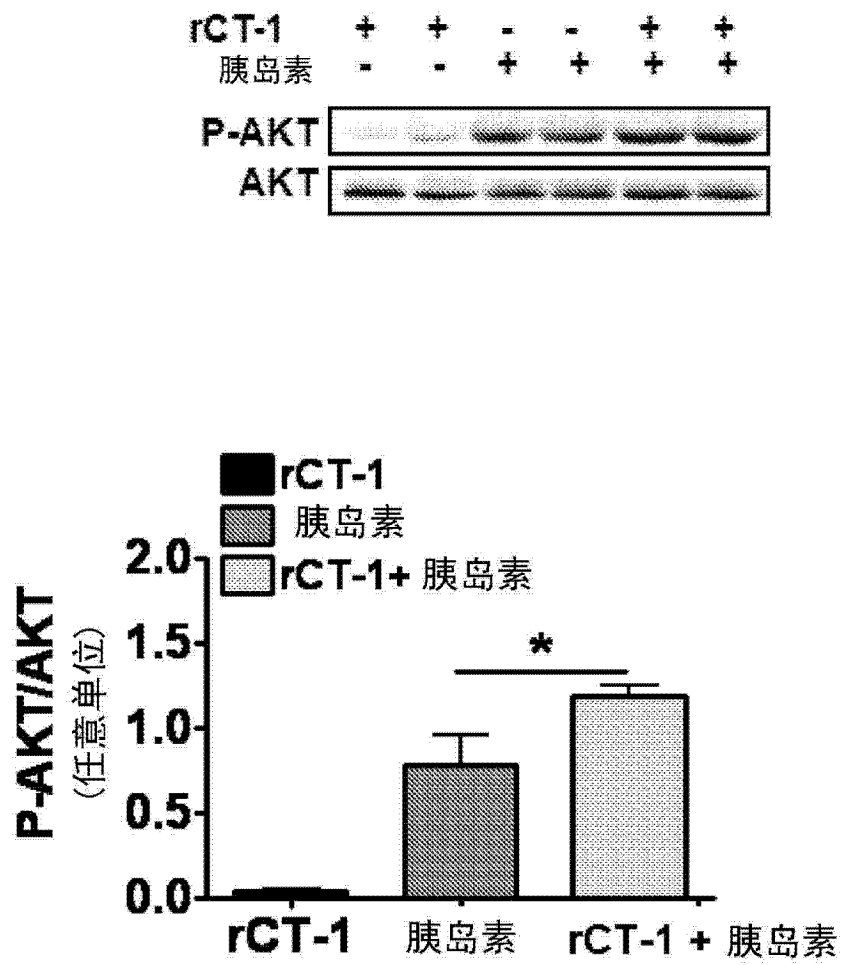


图 27

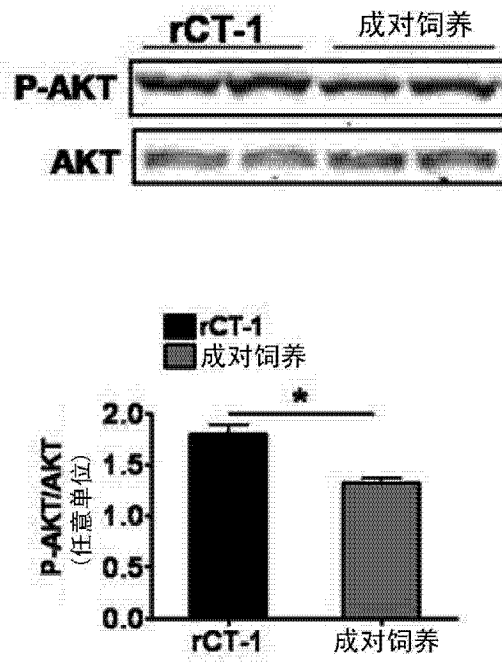


图 28