



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117769414 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 26

(21) 申请号 202280034413.4

(22) 申请日 2022.05.02

(30) 优先权数据

63/183,868 2021.05.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/027261 2022.05.02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/235557 EN 2022.11.10

(71) 申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

申请人 贝勒医学院

(72) 发明人 乔纳森·隆 维罗妮卡·李

史蒂文·巴尼克 徐勇 何洋

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司

11363

专利代理师 许伟群 林潮

(51) Int.Cl.

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 7/12 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

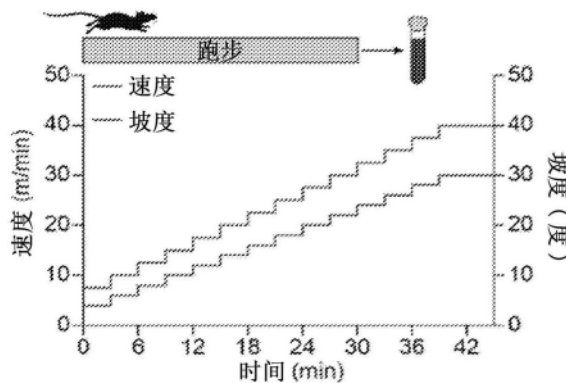
权利要求书1页 说明书33页 附图23页

(54) 发明名称

用于治疗代谢疾病的乳酰氨基酸

(57) 摘要

提供了治疗受试者的代谢病症的方法。该方法的方面包括向受试者施用有效量的N-乳酰-氨基酸。还提供了包含有效治疗代谢病症的量的N-乳酰-氨基酸的药物制剂。任何合适的N-乳酰-氨基酸或N-乳酰-氨基酸组合均可在主题方法中施用。



1. 一种治疗受试者的代谢病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的N-乳酰-氨基酸。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述N-乳酰-氨基酸为N-乳酰-苯丙氨酸。
3. 根据权利要求1-2中的任一项所述的方法,其中所述有效量包括当施用时产生与身体活动后所观察到的所述N-乳酰基-氨基酸的血浆浓度相当的所述N-乳酰基-氨基酸的血浆浓度的所述N-乳酰基-氨基酸的量。
4. 根据权利要求1-3中的任一项所述的方法,其中所述代谢病症为肥胖症。
5. 根据权利要求1-4中的任一项所述的方法,其中所述代谢病症为肥胖症相关的代谢病症。
6. 根据权利要求1-5中的任一项所述的方法,其中所述代谢病症为糖尿病。
7. 根据权利要求1-6中的任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的食物摄入与所述受试者在治疗前的食物摄入相比减少。
8. 根据权利要求1-7中的任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的体重与所述受试者在治疗前的体重相比减轻。
9. 根据权利要求1-8中的任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的葡萄糖稳态与所述受试者在治疗前的葡萄糖稳态和/或葡萄糖清除率相比改善。
10. 根据权利要求1-9中的任一项所述的方法,其中所述方法使脂肪组织质量与所述受试者在治疗前的脂肪组织质量相比减少。
11. 根据权利要求1-10中的任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述N-乳酰基-氨基酸与用于治疗所述代谢病症的一种或更多种疗法组合施用。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括用于治疗所述代谢病症的活性剂。
13. 根据权利要求11-12中的任一项所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括低热量饮食。
14. 根据权利要求11-13中的任一项所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括手术干预。
15. 一种药物制剂,包含:
有效治疗代谢病症的量的N-乳酰基-氨基酸;和
赋形剂。

用于治疗代谢疾病的乳酰氨基酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(E),本申请要求2021年5月4日提交的美国临时专利申请序列号63/183,868的提交日的优先权,该临时申请的公开内容通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 代谢病症通常是指一系列以干扰身体代谢的缺陷为特征的病症,而代谢是身体将蛋白质、碳水化合物和脂肪转化为能量的化学过程。代谢病症可以包括由葡萄糖代谢改变引起的病症。代谢病症的实例包括肥胖症、代谢综合征、糖耐量受损和血脂异常。代谢病症也可由患病或功能失调的器官引起。糖尿病是由患病和/或功能失调的器官(胰腺)引起的代谢病症的实例。

[0004] 肥胖症一般定义为相对于去脂体重身体脂肪过多,是导致发病率和死亡率增加的一个重大因素。肥胖症最常见的原因是食物摄入过多加上能量消耗有限和/或缺乏体育运动,通常伴有各种葡萄糖代谢病症。肥胖症会增加个体患各种疾病的可能性,如糖尿病、高血压、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、痛风、风湿病和关节炎。肥胖症通常与心理病态和医学病态有关,医学病态包括关节问题、血管疾病(如冠状动脉疾病)、高血压、中风和周围血管疾病增加。肥胖症还会导致代谢异常,如胰岛素抵抗和II型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM))、高脂血症和内皮功能障碍。

发明内容

[0005] 提供了治疗受试者的代谢病症的方法。该方法的方面包括向受试者施用有效量的N-乳酰-氨基酸。还提供了包含有效治疗代谢病症的量的N-乳酰-氨基酸的药物制剂。

附图说明

[0006] 图1A-D显示小鼠在跑步机跑步一次后,血浆中的Lac-Phe被强烈诱导。(A)小鼠中针对跑步机跑步的速度和坡度方案的示意图。(B)在跑步后小鼠与静坐小鼠中通过非靶向代谢组学检测到的所有血浆峰的T-stat值。(C)运动后(红色迹线)或静坐(蓝色迹线)血浆中 $m/z=236.0928$ 质量的提取的离子色谱图。(D)真实Lac-Phe标准品(上)和内源性 $m/z=236.0928$ 质量(下)的串联MS片段(左)和结构归属(右)。对于B和C, $N=5$ /组。

[0007] 图2A-I显示Lac-Phe抑制食物摄入和肥胖症并改善葡萄糖稳态。(A-B)注射媒介物(蓝色)或Lac-Phe(红色,50mg/kg,腹膜内[IP])后的22周龄雄性DIO小鼠的累积食物摄入(A)和行走活动(B)。(C-D)每天用媒介物(蓝色)或Lac-Phe(红色,50mg/kg/天,腹膜内[IP])处理的22周龄雄性DIO小鼠的累积食物摄入(C)和体重变化(D)。(E)媒介物或Lac-Phe处理的小鼠的葡萄糖耐量测试(1g/kg葡萄糖)。GTT在第10天最后一次Lac-Phe剂量后一天、禁食6小时后进行。(F-G)媒介物或Lac-Phe处理10天后小鼠的组织重量(F)和脂肪组织的代表性图像(G)。(H)在用媒介物(黑色)或Lac-Phe(红色,50mg/kg/天,IP)处理5天后的15周龄雄性DIO小鼠或媒介物处理的配对喂养小鼠(蓝色)的平均每日食物摄入(左)和体重变化(右)。

(I) 13周龄雄性DIO小鼠在用媒介物(黑色)、乳酸(蓝色, 50mg/kg/天, IP)、苯丙氨酸(灰色, 50mg/kg/天, IP)或Lac-Phe(红色, 50mg/kg/天, IP)处理7天后的平均每日食物摄入(左)和体重变化(右)。对于(A-B), N=6/组;对于(C-H), N=8-10/组;对于(I), N=5/组。数据显示为平均值±SEM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。

[0008] 图3A-H显示在体外来自巨噬细胞的Lac-Phe的CNDP2-和乳酸-依赖性生物合成和分泌。(A) RAW264.7细胞的条件培养基和细胞裂解物中的Lac-Phe水平。(B) WT或CNDP2-KO RAW264.7细胞的细胞裂解物的抗CNDP2或抗β微管蛋白蛋白质印迹。(C) WT和CNDP2-KO RAW264.7细胞的条件培养基和细胞裂解物中的Lac-Phe水平。(D) 对从WT或CNDP2-KO小鼠分离的原代腹膜巨噬细胞的细胞裂解物进行抗CNDP2或抗β微管蛋白蛋白质印迹。(E) WT和CNDP2-KO原代腹膜巨噬细胞的条件培养基和裂解物中的Lac-Phe水平。(F, G) 用乳酸(25mM)处理后, WT RAW264.7 (F) 和WT腹膜巨噬细胞(G)的条件培养基和裂解物中的Lac-Phe水平。(H) Lac-Phe体外合成示意图。对于(A)、(C)和(E-G), n=3-5/组。数据显示为平均值±SEM, **p<0.01。

[0009] 图4A-F显示Lac-Phe生物合成的基因缺损导致食物摄入增加和肥胖症。(A) WT小鼠组织裂解物的抗CNDP2蛋白质印迹。(B) 静坐和运动条件下雄性WT(蓝色)和CNDP2KO(红色)小鼠的血浆中Lac-Phe的相对丰度。(C-F) 致肥胖症饮食/运动训练方案下WT(蓝色)和CNDP2-KO(红色)小鼠的每日累积食物摄入(C)、体重(D)、组织重量(E)和脂肪组织代表性图像(F), 其中给小鼠喂食高脂肪饮食(60% kcal来自脂肪)并通过跑步机跑步5天/周进行运动(参见方法)。在第41天拍摄组织重量和图像。对于(B), N=6/组。对于(C-F), N=8-9/组。数据显示为平均值±SEM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。

[0010] 图5A-J显示Lac-Phe直接作用于培养物中的AgRP+和POMC+神经元。(A) 用媒介物(左)或Lac-Phe(50μM, 右)处理后AgRP+神经元的代表性动作电位放电痕迹。(B, C) 所示浓度的Lac-Phe对AgRP+神经元的动作电位放电频率(B)和超极化(C)的影响。(D) 在抑制剂混合物(河豚毒素: 1μM, 荷包牡丹碱: 50μM, DNQX: 20μM和D-AP5: 50μM)存在下用Lac-Phe(50μM)处理后AgRP+神经元的代表性电生理学记录。(E) 单独或在存在抑制剂混合物的情况下使用不同浓度的Lac-Phe处理后AgRP+神经元的响应比。(F) 使用媒介物(左)或Lac-Phe(50μM, 右)处理后POMC+神经元的代表性动作电位放电痕迹。(G, H) 所示浓度的Lac-Phe对POMC+神经元的动作电位放电频率(G)和超极化(H)的影响。(I) 在存在抑制剂混合物的情况下用Lac-Phe(50μM)处理后POMC+神经元的代表性电生理学记录。(J) 单独或在存在抑制剂混合物的情况下使用不同浓度的Lac-Phe处理后POMC+神经元的响应比。对于(A-J), N=8-15个神经元/组。数据显示为平均值±SEM, **p<0.01, ***p<0.001。

[0011] 图6A-F显示了人类运动后Lac-Phe的强劲且持续的升高。(A) 人剧烈跑步机运动研究设计示意图, N=36。(B) 响应于剧烈跑步机跑步, 血浆中运动调节的代谢物(深蓝色)、脂质(灰色)或蛋白质(浅蓝色)的错误发现率。化学式与Lac-Phe的化学式相匹配的以前未指定的代谢物以红色显示。(C) 运动或静坐后人体血液中Lac-Phe和乳酸的时间进程。(D) 人交叉剧烈运动研究设计示意图, N=8。(E) 冲刺(红色)、抗阻(蓝色)和耐力(浅蓝色)试验后运动前后Lac-Phe水平的时间进程。(F) 三种运动方式运动前后血浆Lac-Phe和乳酸水平的相关性。数据显示为平均值±SEM, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001。

[0012] 图7A-B显示了阳性代谢物对照和m/z=236峰的认识。(A) 运动与静坐条件下所示

代谢物的倍数变化。 $N=5$ /组,数据显示为平均值 \pm SEM,** $p<0.01$,*** $p<0.001$ 。(B)内源性 $m/z=236.0928$ 质量与真实的Lac-Phe标准品的共洗脱。

[0013] 图8A-C显示了用Lac-Phe急性处理的肥胖症小鼠的附加代谢参数。(A-C)22周龄DIO小鼠在单次注射媒介物或Lac-Phe(50 mg/kg, IP)后12小时耗氧量 V_{O_2} (A)、二氧化碳产量 V_{CO_2} (B)和呼吸交换比RER(C)。 $N=6$ /组,数据显示为平均值 \pm SEM。

[0014] 图9A-C显示了体外Lac-Phe产量的表征。(A)来自过夜孵育后一组细胞系的条件培养基中的Lac-Phe水平。(B)过夜孵育后RAW264.7细胞的细胞裂解物或条件培养基中所示代谢物的丰度百分比。(C)CNDP2催化的Lac-Phe生物合成反应图。对于(A,B),数据显示为平均值 \pm SEM,* $p<0.05$ 。

[0015] 图10A-D显示了Lac-Phe对脑切片中的血清素和SF1神经元的影响。(A,B)Lac-Phe(50 μ M)处理5-HT+神经元的代表性动作电位放电痕迹(A)和响应比(B)。(C,D)Lac-Phe(50 μ M)处理SF1+神经元的代表性动作电位放电痕迹(C)和响应比(D)。对于(C-D), $N=14-15$ 个神经元/组。

[0016] 图11A-D显示了人类血浆Lac-Phe水平的附加特征。(A,B)真实Lac-Phe标准品(蓝色)和来自人血浆的 $m/z=236.0928$ 质量(红色)的串联MS片段(A)和共洗脱(B)。(C)来自人类剧烈跑步机运动研究(队列1, $N=36$)的单次剧烈跑步机跑步前后的血液中Lac-Phe(红色)、乳酸(蓝色)和苯丙氨酸(浅蓝色)水平的时间进程。(D)来自人类交叉剧烈运动研究(队列2, $N=8$)的冲刺(红色)、抗阻(蓝色)和耐力(浅蓝色)运动前后乳酸水平的时间进程。对于(C-D),数据显示为平均值 \pm SEM,** $p<0.01$,*** $p<0.001$ 。

[0017] 图12A-E显示了小鼠运动血浆代谢组的附加特征。(A)在我们的非靶向代谢组学分析中检测到的代谢物的倍数变化,已知这些代谢物会随着身体活动而增加。基础条件和运动条件分别以蓝色和红色表示。(B)真实的Lac-Phe标准品(蓝色)和来自小鼠运动血浆的内源性 $m/z=236.0928$ 质量(红色)的共洗脱。(C)静坐条件(蓝色)和运动条件(红色)下小鼠血浆中Lac-Phe的绝对定量。(D)在基础条件(蓝色)和运动条件(红色)下小鼠血浆中20个N-乙酰-氨基酸缀合物的总离子计数。(E)基础条件下、运动后立即、运动后30分钟和120分钟时小鼠血浆中Lac-Phe的时间进程。对于(A,C-E),以每组 $N=3-5$ 进行研究,数据显示为平均值 \pm SEM,* $p<0.05$,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$ 。

[0018] 图13A-J显示Lac-Phe直接作用于培养物中的AgRP+和POMC+神经元,并包含与图5(上文)类似的信息。(A)用媒介物(左)或Lac-Phe(50 μ M,中)或在存在抑制剂混合物(河豚毒素:1 μ M,荷包牡丹碱:50 μ M, DNQX:20 μ M, D-AP5:50 μ M,右)情况下的Lac-Phe(50 μ M)处理后,AgRP+神经元的代表性动作电位放电痕迹。(B)单独Lac-Phe(左, $n=12$ 个神经元)或存在抑制剂混合物下Lac-Phe(右, $n=9$ 个神经元)处理后AgRP+神经元的响应比。(C)Lac-Phe处理前后AgRP+神经元放电频率的定量。(D-E)单独Lac-Phe(D)或存在抑制剂混合物下Lac-Phe(E)处理前后AgRP+神经元静息膜电位的定量。(F-J)Lac-Phe对POMC+神经元的影响。(F)在使用媒介物(左)、Lac-Phe(50 μ M,中)或存在抑制剂混合物的情况下Lac-Phe(50 μ M,右)处理后,POMC+神经元的代表性动作电位放电痕迹。(G)单独Lac-Phe(左, $n=16$ 个神经元)或存在抑制剂混合物下Lac-Phe(右, $n=15$ 个神经元)处理后POMC+神经元的响应比。(H)Lac-Phe处理前后POMC+神经元放电频率的定量。(I-J)单独Lac-Phe(I)或存在抑制剂混合物下Lac-Phe(J)处理前后POMC+神经元静息膜电位的定量。对于(A-J), $N=8-15$ 个神经元/组。数据显

示为平均值,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ 。

[0019] 图14A-E显示人类运动诱导Lac-Phe持续升高并且与BMI和脂肪质量呈负相关。(A) 人剧烈跑步机运动研究设计示意图,N=36。(B) 响应于剧烈跑步机跑步,血浆中运动调节的代谢物(深蓝色)、脂质(灰色)或蛋白质(浅蓝色)的错误发现率。化学式与Lac-Phe的化学式相匹配的以前未指定的代谢物以红色显示。(C) 受试者运动前后血浆中Lac-Phe(红色)、乳酸(蓝色)和苯丙氨酸(浅蓝色)的时间进程。(D) 运动后30分钟的循环Lac-Phe水平与人口统计和生理标志物的关联。(E) 运动后30分钟的循环Lac-Phe水平与BMI(左)和估计的脂肪质量(右)的关联。

[0020] 图15显示Lac-Phe也存在于人类中,并且循环水平随着运动和食物摄入而变化。(上) 研究设计示意图,标明运动和食物消耗发生的时间以及血液采样的时间,N=36。(下) 受试者运动前后(左)以及整个实验(包括食物摄入后)中Lac-Phe(红色)、乳酸(蓝色)和苯丙氨酸(绿色)的时间进程(右)。

[0021] 图16显示运动诱导的Lac-Phe峰值与体重指数和脂肪质量负相关。运动后30分钟的循环Lac-Phe水平与BMI(左)、估计的脂肪质量(中)和脂肪质量百分比(右)的关联。

[0022] 图17显示对饮食诱导的肥胖症小鼠施用Lac-Phe抑制食欲和体重并改善葡萄糖稳态。(上) 用媒介物(蓝色)或Lac-Phe(红色,50mg/kg/天,IP)处理9天后的18周龄雄性DIO小鼠的体重(左)和体重变化(右)。(下) 媒介物或Lac-Phe处理小鼠的葡萄糖耐量测试(1g/kg葡萄糖,左)。GTT在禁食6小时后进行。注射媒介物(蓝色)或Lac-Phe(红色,50mg/kg,腹腔内,IP)后小鼠的累积食物摄入(右)。N=10/组。数据显示为平均值 \pm SEM;* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。

[0023] 图18显示了Lac-Phe的抗肥胖症作用需要完整的酰胺缀合物。13周龄雄性DIO小鼠用媒介物(黑色)、乳酸(蓝色,50mg/kg/天,IP)、苯丙氨酸(绿色,50mg/kg/天,IP)或Lac-Phe(红色,50mg/kg/天,IP)处理7天后的体重变化。N=5/组。数据显示为平均值 \pm SEM;* $p < 0.05$ 。

[0024] 图19A-C显示Lac-Phe是巨噬细胞以乳酸和CNDP2依赖性方式分泌的代谢物。(A) 来自过夜孵育后一组细胞系的条件培养基的Lac-Phe水平。(B) RAW264.7细胞的条件培养基和细胞裂解物中的Lac-Phe水平。(C) 来自WT或CNDP2-KO RAW264.7细胞的细胞裂解物的抗CNDP2或抗 β 微管蛋白蛋白质印迹(左)。WT和CNDP2-KO RAW264.7细胞的条件培养基和细胞裂解物中的Lac-Phe水平(中)。用乳酸(25mM)处理后,WT RAW264.7细胞的条件培养基和裂解物中的Lac-Phe水平。对于(A-C),N=3-5/组。数据显示为平均值 \pm SEM,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。

[0025] 图20C-F显示没有Lac-Phe的小鼠表现出食物摄入增加和肥胖症。WT(蓝色)和CNDP2-KO(红色)小鼠在致肥胖症饮食/运动训练方案下的体重(C)、累积食物摄入(D)、图像(E)和组织重量(F),其中给小鼠喂食高脂肪饮食(60% kcal来自脂肪)并每周在跑步机上跑步5天进行运动(参见方法)。对于(C-F),N=8-9/组。数据显示为平均值 \pm SEM,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ 。

[0026] 图21显示CNDP2-KO小鼠已消除血液中的Lac-Phe水平。在静坐和运动条件下,雄性WT(蓝色)和CNDP2-KO(红色)小鼠血浆中Lac-Phe的相对丰度。N=6/组数据显示为平均值 \pm SEM,* $p < 0.05$,*** $p < 0.001$ 。

[0027] 图22A-B 14周DIO小鼠在注射媒介物(紫色)、Lac-Phe(蓝色)、Lac-Leu(灰色)、Lac-Ile(浅蓝色)、Lac-Val(绿色)或Lac-Met(青色)后体重变化(a)和每日食物摄入(b)。处理为50mg/kg/天,IP,n=4。

具体实施方式

[0028] 提供了治疗受试者的代谢病症的方法。该方法的方面包括向受试者施用有效量的N-乳酰-氨基酸。还提供了包含有效治疗代谢病症的量的N-乳酰-氨基酸的药物制剂。

[0029] 在更详细地描述本发明之前,应当理解,本发明不限于所描述的特定实施方案,因此当然可以变化。还应当理解,本文所使用的术语仅是为了描述特定实施方案的目的,并且不旨在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0030] 在提供数值范围的情况下,应当理解,在该范围的上下限之间的每个中间值(除非上下文另外明确指出,否则直至下限单位的十分之一)以及所陈述范围中的任何其他陈述值或中间值都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在该较小范围内并且也涵盖在本发明内,但受到所陈述范围中任何具体排除的限制的影响。当所陈述范围包括一个或两个限值时,排除其中一个或两个所包括的限值的范围也包括在本发明中。

[0031] 本文中给出的某些范围的数值前面带有术语“约”。本文使用术语“约”来为其后的确切数字以及与该术语后面的数字接近或近似的数字提供字面支持。在确定数字是否接近或近似具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是这样的数字,其在呈现的上下文中提供与具体列举的数字的基本等同物。

[0032] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。现在描述代表性的说明性方法和材料,尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试。

[0033] 本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体且单独地指示通过引用并入一样,并且通过引用并入本文以公开和描述与出版物引用相关的方法和/或材料。对任何出版物的引用是针对其在申请日之前的公开内容,并且不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于此类出版物。此外,所提供的发布日期可能与实际发布日期不同,这可能需要独立确认。

[0034] 应注意的是,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。还应当注意的是,权利要求可以被撰写为排除任何可选元素。因此,该陈述旨在充当结合权利要求要素的叙述使用诸如“唯一”、“仅”等排他性术语,或使用“否定”限制的先行基础。

[0035] 如本领域技术人员在阅读本公开后将显而易见的是,本文中描述和示出的各个实施方案中的每一个都具有分立的组分和特征,这些组分和特征可以容易地与其他若干实施方案中的任何一个的特征分离或组合而不背离本发明的范围或精神。任何所叙述的方法可以按照所叙述的事件的顺序或者以逻辑上可能的任何其他顺序来执行。

[0036] 为了语法流畅性和功能性解释已经或将要描述该装置和方法,但是应当明确理解,除非根据35U.S.C.§112明确表述,否则权利要求书不应被解释为以任何方式必然受到对“装置”或“步骤”限定的解释的限制,而是应被赋予在等同司法原则下权利要求所提供的定义的含义和等同项的全部范围,而权利要求根据35U.S.C.§112明确表述的情况应当在

35U.S.C. §112下被赋予所有的法定等同项。

[0037] 在进一步描述本发明的各个方面时,首先更详细地回顾所述方法,然后回顾可用于该方法的实施方案的药物制剂。

[0038] 方法

[0039] 如上所述,提供了治疗受试者代谢病症的方法。该方法可以包括向受试者施用有效量的N-乳酰-氨基酸。如本文所用,术语“治疗”或“改善”是指治疗性处理,其中目的是逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止与疾病或病症相关的病况(例如,肥胖症)的进展或严重程度。术语“治疗”包括减少或减轻病况、疾病或病症的至少一种副作用或症状。如果一种或更多种症状或临床标志物减少,则治疗通常是“有效的”。或者,如果疾病的进展减少或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,还包括与不治疗的情况下预期的情况相比,症状的停止或至少减缓症状的进展或恶化。有益的或期望的临床结果包括但不限于减轻一种或更多种症状、降低疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态、缓解(无论是部分缓解还是全部缓解)和/或死亡率降低,无论是可检测的还是不可检测的。术语疾病的“治疗”还包括疾病的症状或副作用的宽慰。如果预期代谢病症的至少一种症状得到减轻、终止、减缓或预防,则代谢病症可以是“被治疗的”。如果代谢病症的复发或进展减少、减慢、延迟或预防,则代谢病症也可以是“被治疗的”。

[0040] 在主题方法中可以施用任何合适的N-乳酰-氨基酸或N-乳酰-氨基酸的组合。如本文所用,以其常规意义,“N-乳酰-氨基酸”或“lac-氨基酸”是指例如通过蛋白酶胞质非特异性二肽酶2(CNDP2)的作用由乳酸和氨基酸形成的化合物,例如代谢物。N-乳酰-氨基酸可以是一种由身体产生的氨基酸,也可以是一种合成产生的氨基酸。施用的N-乳酰-氨基酸中的氨基酸可以是任何合适的氨基酸,包括例如苯丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、色氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、亮氨酸等。在一些情况下,在主题方法中施用的N-乳酰-氨基酸是在身体活动期间或之后在体内存在的(例如,可检测的)那些。在一些情况下,在主题方法中施用的N-乳酰-氨基酸是其中N-乳酰-氨基酸在身体活动期间或之后在体内(例如,血浆)中的水平升高或降低的那些。在一些情况下,主题方法包括施用本文所述的任何N-乳酰-氨基酸的类似物。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸是N-乳酰-苯丙氨酸(例如,Lac-Phe)。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸是N-乳酰-亮氨酸(例如,Lac-Leu)。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸是N-乳酰-异亮氨酸(例如,Lac-Ile)。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸是N-乳酰-缬氨酸(例如,Lac-Val)。在一些情况下,施用多种N-乳酰-氨基酸,包括例如两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十个或更多种N-乳酰-氨基酸。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸不是N-乳酰-甲硫氨酸(例如,Lac-Met)。

[0041] 可以施用任何合适量的N-乳酰-氨基酸。在一些情况下,施用有效治疗代谢疾病或相关病况的量,例如有效量。在一些情况下,施用有效治疗代谢疾病或相关病况的多个N-乳酰-氨基酸中的每种N-乳酰-氨基酸的量。例如,当施用多种N-乳酰-氨基酸时,可以施用每种N-乳酰-氨基酸的有效量。在一些情况下,有效量包括当施用时产生与在身体活动期间或之后在受试者中观察到的N-乳酰-氨基酸血浆浓度相当(例如,等同)的N-乳酰-氨基酸血浆

浓度相当的N-乳酰-氨基酸的量。例如,有效量可以等于身体活动期间或之后受试者体内(例如血浆)存在的N-乳酰-氨基酸的量。在一些情况下,有效量包括当施用产生与身体活动后恢复期(例如,身体活动后的一段时间,范围从1分钟到5小时,包括例如从1分钟到4小时、从1分钟到3小时、从1分钟到2小时、从1分钟到1小时、从1分钟到30分钟或从1分钟到15分钟)期间或恢复后在受试者中观察到的N-乳酰-氨基酸血浆浓度相当(例如,等同)的N-乳酰-氨基酸血浆浓度的N-乳酰-氨基酸的量。例如,有效量可以等于身体活动后恢复期期间或之后体内(例如血浆)存在的量。身体活动可以包括一段时间内任何量的身体活动。在一些情况下,身体活动包括在1分钟至2小时(包括例如1分钟至1小时或1分钟至30分钟)的一段时间内进行的身体活动量。身体活动可以包括例如使心率高于静息心率的任何活动、身体移动、运动、为维持或实现身体健康而进行的任何活动等。在一些情况下,有效量包括单一单位剂量的N-乳酰-氨基酸。在一些情况下,有效量包括一个或更多个单位剂量的N-乳酰-氨基酸,包括例如两个或更多个剂量、三个或更多个剂量、四个或更多个剂量等。在一些情况下,施用单剂量。在一些情况下,施用多次剂量,例如两次或更多次、三次或更多次等。有效量可以在1mg/kg至500mg/kg的范围内,包括例如1mg/kg至400mg/kg、1mg/kg至300mg/kg、1mg/kg至200mg/kg、1mg/kg至100mg/kg。

[0042] 在一些情况下,该方法包括施用有效诱导受试者的身体活动相关结果(例如,有效导致受试者经历身体活动相关结果)的量的N-乳酰-氨基酸。“身体活动相关结果”是指与身体活动在受试者中诱导的结果等同(例如,幅度和持久性等同)的结果、变化或效果(例如,生物的、物理的和/或化学的)。感兴趣的主体活动相关结果包括但不限于体重减轻、预防或治疗代谢病症和相关病况、改善葡萄糖稳态、改善思维或认知、改善情绪、减轻情绪障碍的严重程度(例如,焦虑和抑郁症)、预防或减缓神经退行性疾病(例如痴呆)的进展、改善睡眠、降低癌症风险等。例如,该方法可以包括施用有效诱导受试者体重减轻的量的N-乳酰-氨基酸,该减轻等同于通过身体活动诱导的体重减轻。在另一个实例中,该方法可以包括施用有效诱导受试者体内葡萄糖稳态改善的量的N-乳酰-氨基酸,该改善等同于通过身体活动所诱导的改善。在另一个实例中,该方法可以包括施用有效诱导受试者情绪改善的量的N-乳酰-氨基酸,该改善等同于通过身体活动诱导的改善。在又一个实例中,该方法可以包括施用有效诱导受试者情绪障碍严重程度降低的量的N-乳酰-氨基酸,该降低等同于通过身体活动所诱导的降低。在又一个实例中,该方法可以包括施用有效诱导神经退行性病症严重程度降低(例如,预防该病症的发展或减缓该病症的进展)的量的N-乳酰-氨基酸,该降低等同于通过身体活动所诱导的降低。在一些实施方案中,该方法包括施用有效治疗神经系统病症和/或相关病况的量的N-乳酰-氨基酸。所述神经系统病症可以包括例如情绪或精神病症(例如,焦虑症、抑郁症、双向情感障碍、季节性情感障碍等)或神经退行性疾病(例如,痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病等)。所述有效量可以是本文描述的任何量。

[0043] 在一些情况下,N-乳酰-氨基酸可以根据给药方案施用。在一些情况下,向受试者施用有效量一次。在一些情况下,每天一次向受试者施用有效量。在一些情况下,每天多次向受试者施用有效量。在一些情况下,有效量在1天至60天,例如1天至10天、1天至7天、1天至5天或1天至3天的时间段内每天施用一次。在一些情况下,在一段时间内每天施用有效量1次至5次,包括例如每天1次至3次、每天2次至5次或每天3次至5次,该时间段为1天至14天,例如1天至10天、1天至7天、1天至5天或1天至3天。

[0044] 在某些实施方案中,该方法包括施用N-乳酰-氨基酸,例如,N-乳酰-苯丙氨酸或与一种或更多种用于治疗代谢病症和/或相关病况(例如,肥胖症)的疗法组合的N-乳酰-氨基酸。在一些情况下,该方法包括将N-乳酰-氨基酸与活性剂(或一种或更多种活性剂的组合)组合施用以治疗代谢病症。在一些情况下,该方法包括将N-乳酰-氨基酸与用于治疗肥胖症的活性剂组合施用。感兴趣的活性剂包括但不限于奥利司他、氯卡色林、芬特明-托吡酯、纳曲酮-安非他酮、利拉鲁肽、芬特明、苯丙胺、二乙苯丙酮、苯甲曲嗪等。在一些情况下,可与N-乳酰-氨基酸组合使用以治疗代谢病症(例如,肥胖症)的疗法包括以下疗法中的任何一种或任何组合:身体活动、饮食计划(例如,低脂肪饮食、低热量饮食、间歇性禁食等)、使用减重装置以及手术干预(例如,减肥手术)。减重装置可以包括例如电刺激系统(例如,阻断胃和脑之间的神经活动的装置)、胃球囊系统(例如,放置在胃中的一个或更多个球囊)和/或胃排空系统(例如,饭后从胃中排出食物的泵和管)。

[0045] 在一些情况下,一种或更多种疗法包括小分子剂。感兴趣的天然存在的或合成的小分子化合物包括许多化学类别,如有机分子,例如分子量大于50且小于约2,500道尔顿的小有机化合物。候选试剂包含用于与蛋白质结构相互作用(特别是氢键)的官能团,并且通常包含至少一个胺、羰基、羟基或羧基基团,优选至少两个化学官能团。候选试剂可以包括被一个或更多个上述官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳族或多芳族结构。候选试剂还见于生物分子中,包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合。在其他方式中,可以通过采用筛选方案来鉴定此类分子。

[0046] 在一些情况下,一种或更多种疗法包括蛋白质或其片段或蛋白质复合物。在一些实施方案中,一种或更多种疗法包括抗体结合剂或其衍生物。如本文所用,术语“抗体结合剂”包括足以结合感兴趣的分析物的多克隆或单克隆抗体或片段。抗体片段可以是例如单体Fab片段、单体Fab'片段或二聚体F(ab)'₂片段。术语“抗体结合剂”的范围还包括通过抗体工程产生的分子,如单链抗体分子(scFv),或通过替换重链和轻链恒定区以产生嵌合抗体或替换恒定区和可变区的框架部分以产生人源化抗体而从单克隆抗体产生的人源化或嵌合抗体。在一些情况下,一种或更多种疗法包括酶或酶复合物。在一些情况下,一种或更多种疗法包括磷酸化酶,例如激酶。在一些情况下,一种或更多种疗法包括复合物,该复合物包括引导RNA和CRISPR效应蛋白,例如Cas9,用于核酸的靶向切割。

[0047] 在一些实施方案中,一种或更多种疗法包括核酸。核酸可以包括DNA或RNA分子。在某些实施方案中,核酸例如通过减少或下调基因的表达来调节(例如抑制或降低)基因或蛋白质的活性。核酸可以是单链或双链,并且可以包括修饰的或未修饰的核苷酸或非核苷酸或其各种混合物和组合。在一些情况下,一种或更多种疗法包括通过RNA剪接的细胞内基因沉默分子和提供可用于抑制基因功能的反义寡核苷酸效应或RNA干扰(RNAi)效应的分子。在一些情况下,基因沉默分子如反义RNA、短临时RNA(stRNA)、双链RNA(dsRNA)、小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、微小非编码RNA(tncRNA)、snRNA、snoRNA和其他RNAi类的小RNA构建体可用于靶向蛋白质编码和非蛋白质编码基因。在一些情况下,核酸包括适体(例如,镜像体)。在一些情况下,核酸包括反义化合物。在一些情况下,核酸包括可用于RNA干扰(RNAi)的分子,如双链RNA,包括小干扰RNA(siRNA)、锁核酸(LNA)抑制剂、肽核酸(PNA)抑制剂等。

[0048] N-乳酰-氨基酸可以通过任何合适的方式施用。如本文所用,术语“施用”包括体内

施用以及直接离体施用至组织。一般而言,施用是例如口服、含服、肠胃外(例如,静脉内、动脉内、皮下)、腹膜内(即,进入体腔内)、局部施用(例如通过吸入或通气(即通过嘴或鼻))或直肠全身(即,影响整个身体)。组合物可以以含有所需的常规无毒药理学上可接受的载体、佐剂和媒介物的剂量单位制剂的形式施用。术语“局部”可以包括注射、插入、植入、局部应用或肠胃外应用。

[0049] 在一些实施方案中,N-乳酰-氨基酸以药物制剂或作为药理学上可接受的组合物施用,其中一种或更多种N-乳酰-氨基酸可以与一种或更多种载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、赋形剂等混合。除了一种或更多种N-乳酰-氨基酸之外,药物组合物还可包含一种或更多种另外的活性成分,如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸组合物包括例如N-乳酰-氨基酸的衍生物或类似物。“衍生物”包括药理学上可接受的盐和化学修饰剂。“类似物”包括结构上与另一者类似但组成略有不同的化合物(如用不同元素的原子替换一个原子或在存在特定官能团的情况下,或用一个官能团替换另一个官能团)。因此,类似物可以是在功能和外观上与参考化合物相似或相当,但在结构或来源上不同的化合物。药物组合物可以通过通常用于施用药物组合物的任何途径来施用。例如,可以局部(包括经眼、阴道、直肠、鼻内)、口服、通过吸入或肠胃外(例如通过静脉滴注或皮下、腹膜内或肌肉注射)进行施用。包含N-乳酰-氨基酸的药物组合物可以在任何合适的温度下储存。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸组合物在1°C至30°C、2°C至27°C或5°C至25°C的温度范围内储存。N-乳酰-氨基酸组合物可以储存在任何合适的容器中,如下文详细描述。

[0050] 通过主题方法治疗的代谢病症可能有所不同。“代谢病症”、“代谢病况”、“代谢疾病”、“代谢疾病相关病况”或“代谢病症相关病况”是指与代谢异常相关的病症或病况。在一些情况下,“代谢病症”是指与葡萄糖调节或血糖控制受损或改变相关或由其加剧的任何病症,例如胰岛素抵抗(insulin resistance)。此类病症包括但不限于糖尿病、高血糖、肥胖症等。可以根据本文所述的方法治疗的与代谢病症相关的代谢病症和病况包括但不限于超重、肥胖症、食欲过盛、糖尿病(包括1型糖尿病和2型糖尿病)、2型糖尿病、糖耐量异常、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、血脂异常、高血压、代谢综合征。通过主题方法治疗的病症还可以是肥胖症和代谢综合征相关病症,例如但不限于脑膜瘤、腺癌、多发性骨髓瘤、肾癌、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、胆囊癌、肝癌、乳腺癌、甲状腺癌和任何其他与肥胖症相关的癌症。包括骨关节炎、中风、胆囊疾病、慢性肾脏疾病和冠状动脉疾病。包括临床抑郁症和焦虑症、双向情感障碍、恐慌症和广场恐惧症等精神障碍。可根据本文描述的方法治疗的代谢病症可单独或以任何组合包含在实施方案中。

[0051] 在一些情况下,代谢病症或代谢病症相关病况是肥胖症。术语“肥胖症”是指以体脂过多为特征的病况。肥胖症的操作定义可以基于体重指数(BMI),其计算为体重比身高的平方(kg/m^2)。肥胖症是指其他方面健康的受试者具有大于或等于 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI的病况,或具有至少一种共病的受试者具有大于或等于 $27\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI的病况。“肥胖症受试者”是BMI大于或等于 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 的其他方面健康的受试者,或BMI大于或等于 $27\text{kg}/\text{m}^2$ 的具有至少一种共病的受试者。“有肥胖症风险的受试者”是BMI为 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至小于 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 的其他方面健康的受试者或BMI为 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 至小于 $27\text{kg}/\text{m}^2$ 的具有至少一种共病的受试者。对于亚洲血统的人来说,体重指数较低时,与肥胖症相关的风险可能会增加。在包括日本在内的亚洲和亚太国家,“肥胖症”是指患有至少一种肥胖症引起的或与肥胖症相关的共病的、BMI大于或等于

25kg/m²的受试者因此需要减轻体重或通过减轻体重来改善的病况。这些国家的“肥胖症受试者”是指患有至少一种肥胖症引起的或与肥胖症相关的共病的、BMI大于或等于25kg/m²的需要减轻体重或通过减轻体重来改善的受试者。在这些国家，“有肥胖症风险的受试者”是指BMI大于23kg/m²至小于25kg/m²的人。

[0052] 在一些情况下,代谢病症是肥胖症相关的代谢病症。术语“肥胖症相关病症”涵盖与肥胖症相关、由肥胖症引起或由肥胖症引起的病症。肥胖症相关病症的实例包括暴饮暴食和贪食症、糖尿病、高血压、血浆胰岛素浓度升高和胰岛素抵抗、血脂异常、高脂血症、乳腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌和结肠癌、心脏病、心血管疾病、异常心律和心律失常、心肌梗塞、充血性心力衰竭、冠心病、心绞痛、脑梗塞、脑血栓及短暂性脑缺血发作。其他实例包括显示代谢活动减少或静息能量消耗占无脂肪总质量百分比减少的病理状况。肥胖症相关病症的其他实例包括代谢综合征,也称为综合征X、胰岛素抵抗综合征、II型糖尿病、空腹血糖受损、糖耐量受损、炎症,如脉管系统的系统性炎症、动脉粥样硬化、高胆固醇血症、高尿酸血症以及肥胖症的次要结果,如左心室肥厚。肥胖症相关的代谢病症还可以包括例如高血压、骨关节炎、II型糖尿病、血压升高、中风和心脏病。肥胖症相关疾病还包括与肥胖症相关的肝脏异常,如脂肪变性或非酒精性脂肪肝病 (NAFLD),这是与肥胖症和代谢综合征相关的肝硬化的一个上升原因。事实上,NAFLD可以表现为简单的脂肪变性,也可以演变成炎症和脂肪性肝炎 (NASH),20年后发生肝硬化的风险为20%。“血脂异常”是冠心病 (CHD) 的主要危险因素。血浆的高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇水平低而低密度 (LDL) 胆固醇水平正常或升高是人类发生动脉粥样硬化和相关冠状动脉疾病的重大危险因素。血脂异常通常与肥胖症有关。另外的肥胖症相关病症描述于例如美国专利号8394969中,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0053] 在一些情况下,代谢病症是糖尿病。“糖尿病”是指由于胰岛素分泌或作用缺陷或两者兼而有之而导致的以高血糖(葡萄糖)水平为特征的一组代谢性疾病。糖尿病根据疾病类型分为胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM; I型糖尿病) 和非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM; II型糖尿病)。“2型糖尿病”是指糖尿病的两种主要类型之一,其中胰腺的β细胞能产生胰岛素(至少在疾病的早期阶段),但身体无法有效地利用它,因为身体细胞对胰岛素的作用有抵抗力。在疾病的后期阶段,β细胞可能会停止产生胰岛素。2型糖尿病也称为胰岛素抵抗型糖尿病、非胰岛素依赖型糖尿病和成人发病型糖尿病。“I型糖尿病”是指因自身免疫介导的胰腺β细胞破坏导致胰岛素生产丧失而导致高血糖的病症。I型糖尿病患者需要胰岛素替代治疗以确保生存。术语“糖尿病病症”可以指由糖尿病引起的并发症。例如,视网膜病、肾病和神经病等并发症以血管病作为糖尿病个体的主要因素而发生。

[0054] 治疗可能会导致不同的结果。在某些实施方案中,肥胖症和肥胖症相关病症的治疗是指施用本文所述的N-乳酰-氨基酸或N-乳酰-氨基酸的组合以减少或维持肥胖症受试者的体重。治疗的一种结果可能是相对于即将施用本文所述的化合物或组合之前的受试者体重而言,减少肥胖症受试者的体重。治疗的另一个结果可能是防止之前因饮食、运动或药物治疗而使减轻的体重恢复,并防止因戒烟而增加体重。治疗的另一个结果可能是减少肥胖症相关疾病的发生和/或严重程度。治疗的另一个结果可能是降低超重或肥胖症受试者患糖尿病的风险。治疗可能导致受试者食物或卡路里摄入的减少,包括总食物摄入的减少,或饮食中特定成分(例如碳水化合物或脂肪)的摄入量的减少;和/或营养吸收的抑制;和/

或抑制代谢率的降低。该治疗可以导致有需要的患者体重减轻。治疗还可以导致代谢率的改变,如代谢率的增加(而不是抑制代谢率的降低或同时还抑制代谢率的降低);和/或最大限度地减少通常由减肥引起的代谢阻力。

[0055] 在一些情况下,该方法预防受试者中肥胖症或肥胖症相关病症的发展。预防肥胖症和肥胖症相关病症是指施用N-乳酰-氨基酸或N-乳酰-氨基酸的组合以减少或维持处于肥胖症风险的受试者的体重。预防的一种结果可能是相对于即将施用本发明的化合物或组合之前的受试者的体重而言,降低有肥胖症风险的受试者的体重。预防的另一个结果可能是防止之前因饮食、运动或药物治疗而使减轻的体重恢复。如果在处于肥胖症风险的受试者中肥胖症发作之前施用治疗,则预防的另一个结果可能是预防肥胖症的发生。如果在具有肥胖症风险的受试者中肥胖症发作之前施用治疗,则预防的另一个结果可能是减少肥胖症相关病症的发生和/或严重程度。此外,如果在已有肥胖症的受试者中开始治疗,则这样的治疗可以预防肥胖症相关病症的发生、进展或严重程度,诸如但不限于动脉硬化、2型糖尿病、多囊卵巢病、心血管疾病、骨关节炎、皮肤病、高血压、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、高甘油三酯血症和胆石症。

[0056] 在某些实施方案中,该方法减少受试者的食物摄入,例如,在治疗期间和/或之后。“食物摄入”是指受试者消耗的食物量。在一些情况下,食物摄入以千卡为单位在一段时间内测量,例如千卡/天。在一些情况下,食物摄入是在1天至14天、例如1天至10天、1天至7天、1天至5天或1天至3天的时间段内的累积食物摄入。在一些情况下,食物摄入是例如在1天至14天、例如1天至10天、1天至7天、1天至5天或1天至3天的时间段内的平均每日食物摄入。在一些情况下,与对照相比(例如,相对于对照),该方法减少受试者的食物摄入。在一些情况下,与治疗前受试者的食物摄入相比,该方法减少受试者的食物摄入。在一些情况下,累积食物摄入减少10%至90%,包括例如10%至80%、10%至70%、10%至60%、10%至50%、10%至40%、10%至30%或10%至20%。在一些情况下,平均每日食物摄入减少10%至90%,包括例如10%至80%、10%至70%、10%至60%、10%至50%、10%至40%、10%至30%或10%至20%。

[0057] 在某些实施方案中,该方法例如在治疗期间和/或之后减轻受试者的体重。在一些情况下,与对照相比(例如,相对于对照),该方法减少受试者的体重。在一些情况下,与治疗前受试者的体重相比,该方法减少受试者的体重。在一些情况下,该方法减少在一段时间内受试者的平均体重,例如1天至14天,例如1天至10天、1天至7天、1天至5天或1天至3天。在一些情况下,与对照相比,该方法降低了受试者的平均体重。在一些情况下,与治疗前受试者的平均体重相比,该方法降低了受试者的平均体重。在一些情况下,体重减少1%至50%,包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。在一些情况下,平均体重减少1%至50%,包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。

[0058] 在某些实施方案中,该方法改善受试者的葡萄糖调节,例如,在治疗期间和/或之后。例如,这些方法可以提高身体调节葡萄糖的能力。如本文所用,术语“葡萄糖调节”或“葡萄糖代谢的调节”是指细胞、组织、器官、器官系统或整个生物体通过改变(例如,增加或减少)葡萄糖代谢的特定过程来维持葡萄糖稳态的过程。葡萄糖代谢或葡萄糖代谢过程涵盖涉及葡萄糖合成、加工、运输、摄取、利用或储存的过程,并且包括糖异生和糖酵解。葡萄糖代谢和调节的具体方面包括葡萄糖转运蛋白或酶的表达,其促进葡萄糖穿过细胞膜的移动

以及细胞对葡萄糖的保留或分泌；参与葡萄糖利用或形成的酶（包括例如糖酵解酶和糖异生酶）的表达和/或活性的改变；以及身体或培养液内葡萄糖分布的改变，包括例如间质液（即细胞外液）和细胞内液、血液、尿液等。

[0059] 在一些实施方案中，该方法改善受试者的葡萄糖稳态，例如，在治疗期间和/或之后。术语“葡萄糖稳态”是指维持生物体中的正常葡萄糖水平，例如正常血糖水平。在一些情况下，与对照相比（例如，相对于对照），该方法改善了受试者的葡萄糖稳态。在一些情况下，与治疗前受试者中的葡萄糖稳态相比，该方法改善了受试者的葡萄糖稳态。在一些情况下，与对照相比，该方法改善了受试者的葡萄糖清除率，例如从循环中的葡萄糖清除率。在一些情况下，与治疗前受试者中的葡萄糖清除率相比，该方法改善了受试者中的葡萄糖清除率。改善的葡萄糖清除率可以包括增加的葡萄糖清除率。葡萄糖清除率增加可能降低血糖水平。在一些情况下，葡萄糖清除率改善1%至50%，包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。

[0060] 在一些实施方案中，该方法减少受试者的脂肪组织质量（例如，脂肪组织或脂肪的量）。术语“脂肪组织”是指脂肪，包括例如储存脂肪的结缔组织。脂肪组织含有多种再生细胞类型，包括例如脂肪源性干细胞（ASC）以及内皮祖细胞和前体细胞。感兴趣的脂肪组织的类型包括但不限于白色脂肪组织和棕色脂肪组织。在一些情况下，该方法使脂肪组织质量与对照相比减少。在一些情况下，该方法使受试者的脂肪组织质量与该受试者在治疗前的脂肪组织质量相比减少。在一些情况下，该方法使脂肪组织减少1%至50%，包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。在一些情况下，该方法使脂肪组织减少10%至50%，包括例如10%至40%、10%至30%、10%至20%、20%至50%、30%至50%或40%至50%。在一些情况下，该方法使白色脂肪的量与对照相比减少。在一些情况下，该方法使受试者的白色脂肪的量与该受试者在治疗前的白色脂肪的量相比减少。在一些情况下，该方法使白色脂肪减少1%至50%，包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。在一些情况下，该方法使白色脂肪减少10%至50%，包括例如10%至40%、10%至30%、10%至20%、20%至50%、30%至50%或40%至50%。在一些情况下，该方法使棕色脂肪的量与对照相比减少。在一些情况下，该方法使受试者的棕色脂肪的量与该受试者在治疗前的棕色脂肪的量相比减少。在一些情况下，该方法使棕色脂肪减少1%至50%，包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。在一些情况下，该方法使棕色脂肪减少10%至50%，包括例如10%至40%、10%至30%、10%至20%、20%至50%、30%至50%或40%至50%。在一些情况下，该方法使较小附睾脂肪的量与对照相比减少。在一些情况下，该方法使受试者的较小附睾脂肪的量与该受试者在治疗前的较小附睾脂肪的量相比减少。在一些情况下，该方法使较小附睾脂肪减少1%至50%，包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。在一些情况下，该方法使较小附睾脂肪减少10%至50%，包括例如10%至40%、10%至30%或10%至20%。在一些情况下，该方法使腹股沟皮下脂肪的量与对照相比减少。在一些情况下，该方法使受试者的腹股沟皮下脂肪的量与该受试者在治疗前的腹股沟皮下脂肪的量相比减少。在一些情况下，该方法使腹股沟皮下脂肪减少1%至50%，包括例如1%至40%、1%至30%、1%至20%或1%至10%。在一些情况下，该方法使腹股沟皮下脂肪减少10%至50%，包括例如10%至40%、10%至30%、10%至20%、20%至50%、30%至50%或40%至50%。

[0061] 如本文所用,“对照”以其常规意义可以是任何合适的对照。在一些实施方案中,对照包括尚未施用有效量的N-乳酰-氨基酸的受试者,例如患有代谢病症的受试者。对照可以是具有与治疗的受试者相同的代谢病症和/或相关病况的受试者。在一些实施方案中,对照包括未施用有效量的N-乳酰-氨基酸的受试者,其中该受试者患有与被施用该有效量的受试者的那些相匹配的代谢病症或代谢病症和/或相关病况的组合。在一些情况下,对照受试者具有与治疗受试者共有的特征(例如,年龄、性别、身高、体重、种族、饮食等)。在一些情况下,相对于治疗前的受试者,衡量本文所述的受试者的结果(涉及例如受试者的食物摄入、受试者的体重、受试者的葡萄糖稳态、受试者的脂肪组织质量等)。

[0062] 该方法的实施方案可以在任何合适的受试者上实践。本发明的受试者可以是“哺乳动物”或“哺乳动物类”,其中这些术语广泛地用于描述哺乳动物纲内的生物体,包括食肉动物目(例如,狗和猫)、啮齿动物目(例如,小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长类动物(例如,人类、黑猩猩和猴子)。在一些情况下,受试者是人类。该方法可应用于两种性别和处于任何发育阶段的人类受试者(即,新生儿、婴儿、少年、青年、成人),其中在某些实施方案中,人类受试者是少年、青年或成人。

[0063] 药物制剂

[0064] 如上所述,提供了药物制剂或药物组合物。药物制剂可包含N-乳酰-氨基酸(或N-乳酰-氨基酸的组合)或其药学上可接受的盐,以及一种或更多种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些情况下,药物制剂包含有效治疗代谢疾病的量的N-乳酰-氨基酸;和赋形剂。N-乳酰-氨基酸可以是任何合适的N-乳酰-氨基酸或如本文所述的N-乳酰-氨基酸的组合。在一些情况下,N-乳酰-氨基酸是N-乳酰-苯丙氨酸。N-乳酰-氨基酸的量,例如有效量,可以根据本文所述的任何实施方案的任何合适的量。药物制剂可以与本文所述的任何疗法(例如,用于治疗代谢病症的疗法)组合施用。

[0065] 药物制剂可以配制用于通过任何合适的方式施用。在某些实施方案中,组合物被配制用于口服、皮内、肌内、肠胃外、静脉内、动脉内、颅内、皮下、眶内、心室内、脊柱内、腹膜内或鼻内施用。药物制剂或组合物可以配制成各种剂型,包括片剂、粉剂、细颗粒剂、粒剂、干糖浆、胶囊、液体组合物等。在一些情况下,药物制剂是胶囊或片剂。在一些情况下,药物制剂是肠胃外制剂。在一些情况下,药物制剂是腹膜内制剂。

[0066] 制药领域通常使用的添加剂和稀释剂可以任选地添加到药物制剂中。这些包括增稠剂、粒化剂、分散剂、调味剂、甜味剂、着色剂和稳定剂,包括pH稳定剂、其他赋形剂、抗氧化剂(例如,生育酚、BHA、BHT、TBHQ、生育酚乙酸酯、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸没食子酸丙酯等)、防腐剂(例如,对羟基苯甲酸酯)等。示例性的防腐剂包括但不限于苯甲醇、乙醇、苯扎氯铵、苯酚、氯丁醇等。一些有用的抗氧化剂为制剂提供氧或过氧化物抑制剂,并且包括但不限于丁基化羟基甲苯、丁基羟基苯甲醚、没食子酸丙酯、抗坏血酸棕榈酸酯、 α -生育酚等。增稠剂,如卵磷脂、羟丙基纤维素、硬脂酸铝等,可以改善制剂的质地。

[0067] 用于容纳N-乳酰-氨基酸制剂或N-乳酰-氨基酸药物组合物的容器可被配置为容纳任何合适体积的N-乳酰-氨基酸制剂或组合物。在一些情况下,容器的大小可以取决于容器中容纳的N-乳酰-氨基酸组合物的体积。在某些实施方案中,容器可以被配置成容纳0.1mg至1000mg、如0.1mg至900mg、如0.1mg至800mg、如0.1mg至700mg、如0.1mg至600mg、如0.1mg至500mg、如0.1mg至400mg、或0.1mg至300mg、或0.1mg至200mg、或0.1mg至100mg,

0.1mg至90mg、或0.1mg至80mg、或0.1mg至70mg、或0.1mg至60mg、或0.1mg至50mg、或0.1mg至40mg、或0.1mg至30mg、或0.1mg至25mg、或0.1mg至20mg、或0.1mg至15mg、或0.1mg至10mg、或0.1mg至5mg、或0.1mg至1mg、或0.1mg至0.5mg的量的N-乳酰-氨基酸组合物。在某些实施方案中,容器被配置为容纳0.1g至10g或0.1g至5g或0.1g至1g或0.1g至0.5g的量的N-乳酰-氨基酸组合物。在某些情况下,容器被配置成容纳0.1ml至200ml的体积(例如,液体N-乳酰-氨基酸组合物的体积)。例如,容器可被配置为容纳0.1ml至1000ml、如0.1ml至900ml、或0.1ml至800ml、或0.1ml至700ml、或0.1ml至600ml、或0.1ml至500ml、或0.1ml至400ml、或0.1ml至300ml、或0.1ml至200ml、或0.1ml至100ml、或0.1ml至50ml、或0.1ml至25ml、或0.1ml至10ml、或0.1ml至5ml、或0.1ml至1ml、或0.1ml至0.5ml的体积(例如,液体的体积)。在某些情况下,容器被配置成容纳0.1ml至200ml的体积(例如,液体N-乳酰-氨基酸组合物的体积)。

[0068] 容器的形状也可以变化。在某些情况下,容器可以被配置成与测定和/或用于执行测定的方法或其他装置兼容的形状。例如,容器可以被配置为用于执行测定的典型实验室设备的形状或与用于执行测定的其他装置兼容的形状。在一些情况下,容器是液体容器。在一些实施方案中,液体容器是小瓶或试管。在某些情况下,液体容器是小瓶。在某些情况下,液体容器是试管。在一些情况下,容器是泡罩包装。

[0069] 如上所述,容器的实施方案可与N-乳酰-氨基酸组合物相容。用于容器的合适材料的实例包括但不限于玻璃和塑料。例如,容器可由玻璃组成,诸如但不限于硅酸盐玻璃、硼硅酸盐玻璃、硼硅酸钠玻璃(例如,PYREX™)、熔融石英玻璃、熔融二氧化硅玻璃等。用于容器的合适材料的其他实例包括塑料,诸如但不限于聚丙烯、聚甲基戊烯、聚四氟乙烯(PTFE)、全氟醚(PFE)、氟化乙烯丙烯(FEP)、全氟烷氧基烷烃(PFA)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚乙烯(PE)、聚醚醚酮(PEEK)等。

[0070] 在一些实施方案中,容器可以是密封的。即,容器可以包括基本上防止容器的内容物离开容器的密封件。容器的密封还可以基本上防止其他物质进入容器。例如,密封件可以是基本上防止液体进入或离开容器的水密封件,或者可以是基本上防止气体进入或离开容器的气密封件。在一些情况下,密封件是可移除的或可破坏的密封件,使得容器的内容物可以在需要时暴露于周围环境,例如,如果需要移取容器的内容物的一部分。在一些情况下,密封件由弹性材料制成以提供用于将样品保留在容器中的屏障(例如,水密和/或气密密封)。密封件的具体类型包括但不限于膜,如聚合物膜、盖等,这取决于容器的类型。用于密封件的合适材料包括例如橡胶或聚合物密封件,诸如但不限于硅橡胶、天然橡胶、苯乙烯丁二烯橡胶、乙烯-丙烯共聚物、聚氯乙烯、聚丙烯酸酯、聚丁二烯、聚氨酯、苯乙烯丁二烯等等,及其组合。例如,在某些实施方案中,密封件是可由针、注射器或插管刺穿的隔膜。密封件还可以提供对容器中的样品的方便访问,以及覆盖容器开口的保护屏障。在一些情况下,密封件是可移除的密封件,如螺纹盖或卡扣盖或可应用于容器的开口的其他合适的密封元件。例如,可以在将样品添加到容器之前或之后将螺纹盖拧在开口上。

[0071] 用途

[0072] 主题方法和制剂可用于涉及代谢病症和与代谢病症相关的一种或更多种病况的应用,例如临床应用。在一些实施方案中,该方法和制剂可用于需要治疗代谢病症和与代谢病症相关的一种或更多种病况(包括例如肥胖症、肥胖症相关病症、糖尿病等)的应用。在一些情况下,该方法和制剂可用于需要预防代谢病症以及与代谢病症相关的一种或更多种病

况的发展或发生的应用。在某些实施方案中,该方法和制剂可用于需要受试者减轻体重的应用。在某些实施方案中,该方法和制剂可用于需要改善受试者体内葡萄糖稳态的应用。在某些实施方案中,该方法和制剂可用于需要在受试者中诱导身体活动相关结果的应用。在某些实施方案中,该方法和制剂可用于需要治疗神经系统病症的应用。该方法和制剂还可以与针对本文描述的任何病症和相关病况的其他疗法和治疗组合使用。

[0073] 提供以下实施例是为了说明而不是限制。

[0074] 实施例

[0075] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的完整公开和描述,并且不旨在限制发明人所认为的其发明的范围,也不旨在表示以下实验是全部或仅有进行的实验。已努力确保所用数字(例如量、温度等)的准确性,但应考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,而压力是大气压或接近大气压。

[0076] 分子和细胞生物化学的一般方法可见于这些标准教科书,如Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第三版.(Sambrook等人,HaRBor Laboratory Press 2001);Short Protocols in Molecular Biology,第四版.(Ausubel等人eds.,John Wiley&Sons 1999);Protein Methods(Bollag等人,John Wiley&Sons 1996);Nonviral Vectors for Gene Therapy(Wagner等人eds.,Academic Press 1999);Viral Vectors(Kaplift&Loewy eds.,Academic Press 1995);Immunology Methods Manual(I.Lefkovits ed.,Academic Press 1997);以及Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology(Doyle&Griffiths,John Wiley&Sons 1998),它们的公开内容通过引用并入本文。本公开中提及或与之相关的方法的试剂、克隆载体、细胞和试剂盒可获自商业供应商,如BioRad、Agilent Technologies、Thermo Fisher Scientific、Sigma-Aldrich、New England Biolabs(NEB)、Takara Bio USA,Inc等以及储存库如Addgene,Inc.、美国典型培养物保藏中心(ATCC)等。

[0077] 实施例1:抑制食物摄入和肥胖症的乳酸衍生的运动诱导代谢物

[0078] 材料和方法

[0079] 细胞系培养。所有细胞系均获自ATCC,并在37°C、5% CO₂下生长。RAW 264.7、HEK293T、HEK293A、C2C12、F442A、3T3-L1、Caco2和SW48在含有10%胎牛血清(FBS)和青霉素/链霉素(pen/strep)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中生长。AML-12细胞在含有10% FBS和补充有胰岛素-转铁蛋白-硒的pen/strep的DMEM中生长。T84细胞在含有5% FBS和青霉素/链球菌的Dulbecco改良Eagle培养基/营养混合物F-12(DMEM/F-12)中生长。

[0080] 一般动物信息。动物实验按照斯坦福大学实验动物护理管理小组(APLAC)批准的程序进行。将小鼠维持在22°C和约50%相对湿度的12小时光暗循环中,并喂食标准的经辐照的啮齿动物饲料。在有指示的情况下,使用高脂肪饮食(D12492,研究饮食,60%kcal来自脂肪)。C57BL/6J(库存号000664)和C57BL/6JDI0小鼠(库存号380050)购自Jackson Laboratory。C57BL/6Ncr1(库存号027)小鼠购自Charles River Laboratory。全身CNDP2敲除小鼠(目录号,C57BL/6Ncr1-Cndp2em1(IMPC)Mbp/Mmucd,RRID:MMRRC_043492-UCD)获自突变小鼠区域资源中心(NCRR-NIH资助的品系库)。为了向小鼠体内注射包括Lac-Phe、乳酸和苯丙氨酸等的化合物,将化合物溶解在18:1:1(体积比)的盐水/Kolliphor EL(Sigma

Aldrich)/DMSO中。每天通过腹膜内注射以5 μ l/g体重的指定剂量向小鼠施用化合物。对于所有注射实验,小鼠均被模拟注射媒介物3-5天,直到体重稳定。对于葡萄糖耐量测试,小鼠禁食6小时,然后以10 μ l/g体重注射葡萄糖。1g/kg的剂量用于媒介物和Lac-Phe处理的肥胖症小鼠的GTT。

[0081] 化学品。L-苯丙氨酸(AAA-1323814)购自Fisher Scientific,L-乳酸钠(L7022)购自Sigma。非市售的Lac-Phe的合成如下所述。

[0082] Lac-Phe(N-乳酰苯丙氨酸)的合成。将L-乳酸钠(1.2当量)溶解在二氯甲烷(0.2M)中,并在0 $^{\circ}$ C、氩气下用3-[双(二甲基氨基)甲基鎓基]-3H-苯并三唑-1-氧化物六氟磷酸盐(HBTU,1.2当量)处理。15分钟后,将二氯甲烷(0.2M)中的苯丙氨酸甲酯盐酸盐(1.0当量)和N,N-二异丙基乙胺(3.0当量)添加至混合物。将反应在氩气下、环境温度下搅拌16小时。除去三分之一的溶剂并用5% HCl、5% NaHCO₃和饱和NaCl溶液洗涤二氯甲烷溶液。将有机层干燥(MgSO₄)、过滤并浓缩。将所得粗产物通过柱色谱纯化,用乙酸乙酯/己烷洗脱,得到N-苯丙氨酸甲酯。将上述酯(1.0当量)溶解在THF(0.5M)中并用水(0.5M)中的氢氧化锂一水合物(2.0当量)处理。将溶液在环境温度下搅拌2小时,并除去溶剂。将所得残余物溶解在二氯甲烷中并通过5% HCl酸化至pH 3。将所得混合物用乙酸乙酯萃取3次并用饱和NaCl溶液洗涤经合并的有机层。将有机层干燥(MgSO₄)、过滤并浓缩。将得到的粗产物用乙酸乙酯/己烷重结晶纯化,得到N-乳酰苯丙氨酸,为白色粉末。¹H-NMR(400MHz, D₂O) δ 7.3-7.2(m, 5H), 4.13[dd, 1H], 4.10[q, 1H], 3.21[dd, 1H], 2.98[dd, 1H], 1.10[d, 3H]。LC/MS(m/z): 236.093[M-H]⁻

[0083] 小鼠跑步方案。对于小鼠跑步研究,使用了6道Columbus Instruments动物跑步机(产品1055-SRM-D65)。在跑步机上跑步之前,让小鼠适应跑步机5分钟。对于剧烈、至力竭的运动研究,跑步机以7.5m/min的速度和4 $^{\circ}$ 的坡度开始。每三分钟,速度和坡度分别增加2.5m/min和2 $^{\circ}$ 。一旦达到40m/min的速度和30 $^{\circ}$ 的坡度,这两个参数都保持恒定,直到小鼠达到力竭。力竭定义为小鼠在跑步机后部的震动器上停留超过5秒。对于WT和CNDP2-KO小鼠的长期跑步实验,小鼠每周运动5天,周一至周五,同时接受高脂肪饮食(60% kcal来自脂肪),并允许每周剩余2天休息。跑步机以恒定的5 $^{\circ}$ 坡度进行,并以6m/min的速度开始。每5分钟速度增加2m/min,直至最大速度30m/min。如上所述,小鼠在达到力竭时停止运动,并使两组小鼠的跑步时间标准化。

[0084] 制备用于LC-MS分析的血浆样品。通过下颌下出血将小鼠的血浆收集到肝素锂管(BD, 365985)中,并立即转移到冰上。将血液在4 $^{\circ}$ C下以5000rpm离心5分钟,将血浆顶层等分并冷冻在-80 $^{\circ}$ C。为了从血浆提取极性代谢物进行LC-MS分析,将150 μ l乙腈/甲醇2:1混合物添加到50 μ l血浆。将混合物在4 $^{\circ}$ C下以15,000rpm离心10分钟,并将上清液转移至LC-MS小瓶。

[0085] 通过LC-MS对代谢物的非靶向测量。在Agilent 6520四极杆飞行时间(Q-TOF) LC/MS上进行非靶向代谢组学测量。使用电喷雾电离(ESI)在负模式下进行质谱分析。双ESI源参数设置如下,气体温度设置为250 $^{\circ}$ C,干燥气流为12l/min,而雾化器压力为20psi。毛细管电压设置为3500V,碎裂电压(fragmentor voltage)设置为100V。极性代谢物的分离采用正相色谱法在Luna 5 μ m NH2100 \AA LC柱(Phenomenex 00B 4378-E0)上进行。流动相如下:缓冲液A、95:5水/乙腈,含0.2%氢氧化铵和10mM乙酸铵。缓冲液B,乙腈。LC梯度在0-2分钟内从

100% B开始,流速为0.2ml/min。然后梯度以0.7ml/min的流速在2-20分钟内线性增加至50% A/50% B。在20-25分钟内,梯度保持在50% A/50% B,流速为0.7ml/min。

[0086] Lac-AA的靶向测量。在Agilent 6470三重四极杆(QQQ) LC/MS上进行靶向测量。使用电喷雾电离(ESI)在负模式下进行质谱分析。AJS ESI源参数设置如下,气体温度设置为250°C,气流为12L/min,而雾化器压力为25psi。鞘气温度设置为300°C,鞘气流设置为12L/min。毛细管电压设置为3500V。极性代谢物的分离按照上述非靶向代谢组学部分所述进行。使用列出的停留时间、碎裂电压、碰撞能量、细胞加速器电压和极性对指定代谢物进行多反应监测(MRM)。

	化合物	前体离子	MS1 Res	产物离子	MS2 Res	停留时间	碎裂电压	碰撞能量	细胞加速器电压	极性
[0087]	N-乙酰 Phe	236.1	单位	88	单位	50	135	10	5	阴性
	花生四 烯酸	303.2	单位	303.2	单位	50	135	0	5	阴性
	油酸	281.2	单位	281.2	单位	50	135	0	5	阴性
[0088]	乳酸	89.0	单位	89.0	单位	50	135	0	5	阴性

[0089] 细胞系的分化。将C2C12细胞铺板于12孔中并生长直至80-90%汇合度。将细胞在含有2%马血清和pen/strep的DMEM中孵育。每2天更换一次培养基,持续4-5天。将F442A细胞铺板于12孔中并生长直至60-70%汇合度。通过向完全培养基添加5µg/ml胰岛素和1µM罗格列酮来使细胞分化。每2天更换一次培养基,持续7-8天。将3T3-L1细胞铺板于12孔中并生长直至80-90%汇合度。通过添加含有5µg/ml胰岛素、5µM地塞米松、250µM异丁基甲基黄嘌呤和1µM罗格列酮的混合物2天来启动分化。诱导后,在剩余的4-6天将细胞维持在5µg/ml胰岛素和1µM罗格列酮中。

[0090] CNDP2-KO RAW 264.7细胞的生成。将Zhang实验室开发的plentiCRISPRv2系统用于生成CNDP2-KO RAW 264.7细胞系。使用的sgRNA是5'-CAGTGAAATGAGATCCGTC-3' (SEQ ID NO:01)。按照Zhang实验室的方案,合成了针对sgRNA和反向互补序列的寡核苷酸,并将其克隆到plentiCRISPRv2载体中(正向寡核苷酸,5'-CACCGCAGTGAAATGAGATCCGTC-3' (SEQ ID

NO:02);反向寡核苷酸,5'-AAACTGACGGATCTCATTTCCTG C-3'(SEQ ID NO:03))。使用polyfect将克隆的pleticRISPRv2质粒与病毒包装psPAX2质粒和病毒包膜pMD2.G质粒共转染,在HEK293T细胞系中生成慢病毒颗粒。使用亲本pleticRISPRv2质粒作为对照。24小时后收获慢病毒上清液并通过0.45uM过滤器过滤。然后将上清液以1:1的比例与聚凝胺混合至最终浓度为8ug/ml聚凝胺。将该混合物添加至在6孔板中的40±50%汇合度的RAW 264.7细胞中。将转导的细胞转移至10cm板,然后用5ug/ml的嘌呤霉素选择3-6天。

[0091] 原代腹膜巨噬细胞分离。给小鼠注射2ml 3% Brewer巯基乙酸盐培养基(Fisher, B11716),并允许巨噬细胞诱导持续3天。为了分离巨噬细胞,用二氧化碳将小鼠处死,并将腹部皮肤剥离以暴露腹膜壁。将10ml冰冷的不含钙和镁的DPBS注入腹腔内,注意不要刺穿器官。轻轻按摩小鼠并使用同一注射器和针头从腹膜吸出液体。将液体分配到冰上的50ml falcon管中。然后将细胞在4℃、400xg下离心10分钟。弃去上清液并将细胞重悬于含有10% FBS和pen/strep的冷DMEM/F-12中。让细胞在培养箱中粘附至少2小时,然后在温PBS中洗涤3次以除去未粘附的细胞。将新鲜培养基添加到细胞,并在分离后1-2天内进行实验。

[0092] 体外Lac-Phe生产测定。将细胞以70-80%汇合度铺在12孔板中。第二天,细胞用PBS洗涤两次并在0.5ml无血清培养基中孵育。过夜孵育后,除去400μl培养基并添加20μl 1M盐酸以酸化培养基并使Lac-Phe质子化。将400μl乙酸乙酯添加到每个样品并涡旋30秒以将Lac-Phe萃取到有机层中。将顶层的300μl转移至新的Eppendorf管中并在氮气流下干燥。将残余物重新悬浮于100ul 80:20乙腈/水混合物中。将细胞保存在冰上以收获裂解物。将150μl PBS添加到每个孔,并将细胞刮入Eppendorf管中。再次重复该步骤以确保所有细胞均已收获。然后将细胞在4℃、2,000xg下离心10分钟,并除去上清液以获得细胞沉淀。使用100μl 2:1:1乙腈/甲醇/水混合物裂解细胞并沉淀大蛋白质。将混合物在4℃、15,000rpm下离心10分钟,并将上清液转移至LC-MS小瓶。

[0093] 蛋白质印迹分析。收集细胞并在含有1:100HALT蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中通过超声裂解。将细胞裂解物在4℃下以13,000rpm离心10分钟,以去除残留的细胞碎片。使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒并结合带有10mM DTT的4x NuPAGE LDS样品缓冲液对上清液的蛋白质浓度进行标准化。然后将样品在95℃下煮沸10分钟。将制备好的样品在NuPAGE 4-12% Bis-Tris凝胶上运行,然后转移到硝酸纤维素膜。印迹在Odyssey封闭缓冲液中于室温封闭30分钟。一抗(兔抗CNDP2和兔抗β-微管蛋白)以1:1000的比例添加到Odyssey封闭缓冲液。将印迹在指定的一抗中孵育过夜,同时在4℃下摇动。第二天,用PBS-T洗涤印迹3次,每次10分钟,然后用二抗在室温下染色1小时。使用的二抗是在封闭缓冲液中稀释至1:10,000的比例的山羊抗兔抗体。二抗染色后,用PBS-T洗涤印迹3次,然后用Odyssey CLx成像系统成像。

[0094] CNDP2 KO动物的产生。CNDP2 KO和野生型动物是通过杂合育种杂交产生的。基因分型如下进行:从同窝小鼠中获得尾剪,并在100μl 50mM NaOH中于95℃煮沸30分钟,以提取基因组DNA。通过添加21μl 0.5M Tris(pH 7.2)中和溶液。通过使用针对CNDP2 WT等位基因的引物(正向:5'-CAGATGGCTCGGAGATACCAC-3'(SEQ ID NO:04),反向:5'-TTCCCGCTCCACCAAGGTGAAG-3'(SEQ ID NO:05))或CNDP2KO等位基因的引物(正向:5'-GCTCTGTAAGGGAAGAGATGACCC-3'(SEQ ID NO:06),反向:5'-AATAGGACATACCCAGTTCTGTGAGG-3'(SEQ ID NO:07))进行PCR反应。针对PCR反应使用

Promega GoTaq主混合物。每个25 μ l反应液包含12.5 μ l promega主混合物(M7122)、2.5 μ l 10 μ M正向和反向引物混合物、2 μ l基因组DNA和8 μ l超纯水。BioRad C1000 Touch热循环仪上的热循环程序始于95 $^{\circ}$ C下最初30秒,然后98 $^{\circ}$ C下30秒、58 $^{\circ}$ C下30秒和72 $^{\circ}$ C下45秒的循环,然后是72 $^{\circ}$ C下5分钟,最后保持在4 $^{\circ}$ C。WT引物的PCR反应由30个循环组成,而KO引物的PCR反应由48个循环组成。样品在含有0.2mg/ml EtBr的2%琼脂糖凝胶上进行电泳。WT等位基因预计会产生大小为160个碱基对的PCR产物,而KO等位基因预计会产生大小为440个碱基对的PCR产物。

[0095] 切片电生理学研究。使用几种遗传小鼠品系对已识别的神经群体进行电生理记录。其中包括AgRP-IRES-Cre/Rosa26-LSL-tdTOMATO小鼠,用于记录下丘脑弓状核(ARH)中的AgRP神经元;POMC-CreER/Rosa26-LSL-tdTOMATO小鼠(8-12周时用200mg/kg他莫昔芬诱导)用于记录ARH中的POMC神经元;SF1-Cre/Rosa26-LSL-tdTOMATO小鼠用于记录下丘脑腹内侧(VMH)的SF1神经元;TPH2-CreER/Rosa26-LSL-tdTOMATO小鼠(8-12周时用200mg/kg他莫昔芬诱导)用于记录中缝背核(DRN)中的5-HT神经元。小鼠(雄性和雌性,8-16周龄)用异氟烷麻醉,并用改良的冰冷蔗糖基切割溶液(pH 7.4;含有10mM NaCl、25mM NaHCO₃、195mM蔗糖、5mM葡萄糖、2.5mM KCl、1.25mM NaH₂PO₄、2mM丙酮酸钠、0.5mM CaCl₂和7mM MgCl₂,用95% O₂和5% CO₂连续鼓泡)经心脏灌注。然后将小鼠斩首,取出整个脑部并立即浸入切割溶液中。使用Microm HM 650V vibratome(Thermo Scientific)切割冠状切片(220 μ m)。为每只相应的小鼠收集包含所需区域(ARH、VMH或DRN)的脑切片,并在整个脑区域的水平进行记录。将切片在32 $^{\circ}$ C下恢复约30分钟,然后在记录之前在含氧(95% O₂和5% CO₂)的人工脑脊液(ACSF,pH 7.4;含有126mM NaCl、2.5mM KCl、2.4mM CaCl₂、1.2mM NaH₂PO₄、1.2mM MgCl₂、11.1mM葡萄糖和21.4mM NaHCO₃)中在室温下再保持1小时。

[0096] 将切片转移至32 $^{\circ}$ C的记录室,并以1.8-2.0ml/min的流速连续灌注含氧ACSF。记录前切片至少平衡5分钟。在配备可移动台(MP-285,Sutter Instrument)的正置显微镜(Eclipse FN-1,Nikon)上使用落射荧光和红外微分干涉对比(IR-DIC)成像对ARH、VMH或DRN中tdTOMATO标记的神经元进行可视化。使电阻为3-5M Ω 的贴片移液器中充满细胞内溶液(pH 7.3),该溶液中含有128mM葡萄糖酸钾、10mM KCl、10mM HEPES、0.1mM EGTA、2mM MgCl₂、0.05mM GTP(钠盐)和0.05mM ATP(镁盐)。使用MultiClamp 700B放大器(Axon Instruments)进行记录,使用Digidata 1440A采样,并使用pClamp 10.3软件(Axon Instruments)进行离线分析。记录过程中监测串联电阻,该值通常<10M Ω ,且未进行补偿。监测并校正液体界面电势。如果实验期间串联电阻变化超过20%或动作电位没有超调,则排除数据。对电流进行放大、以1kHz滤波,并以10kHz进行数字化。接上电流钳来测试基线时和喷洒递送Lac-Phe后的神经放电频率和静息膜电位(RM)(图中所示的各种浓度下5秒)。为了确保每个记录的神经元接收到相同量的Lac-Phe,选择位于切片表面的神经元进行记录,并且喷洒管始终放置在与记录的神经元距离水平100 μ m和垂直100 μ m处。使用可重复的压力脉冲系统(Picospritzer III,Parker)将喷洒强度保持同一水平。在一些实验中,含有1 μ M河豚毒素(TTX,Tocris)、50 μ M荷包牡丹碱(Tocris)、20 μ M DNQX(Tocris)和50 μ M D-AP5(Tocris)的ACSF溶液用于阻断大部分突触前输入。每个神经元在基线时记录至少1分钟,并且仅使用基线稳定的神经元来测试Lac-Phe处理。RM和放电频率的值在基线和1分钟范围内取平均值,该1分钟范围包含POMC、SF1和5-HT神经元中Lac-Phe喷洒后静息膜电位变化最大

的点。对于AgRP神经元, RM和放电频率的值在图中所示的每个时间点处在40秒内取平均值。如果膜电位的变化至少为2mV, 则神经元被认为是去极化或超极化, 而2mV之间的值被定义为“无响应”。

[0097] 人体运动研究-单次剧烈跑步机跑步。这项研究是由斯坦福大学斯奈德实验室进行的, 参考文献#中详细描述了实验模型和主题细节。简而言之, 36名健康的研究参与者被招募并同意参加斯坦福大学机构审查委员会 (IRB 23602) 批准的运动研究。参与者到达测试机构时已禁食过夜 (10-12小时), 并在斜坡跑步机上接受症状限制心肺运动 (CPX) 测试。根据每个参与者的健康水平制定个性化方案, 并鼓励参与者运动直至达到最大运动能力, 持续8-12分钟。在运动前以及运动后2分钟、15分钟、30分钟和1小时从前臂上静脉静脉采集血液。在非靶向代谢组学平台上分离并分析血浆。

[0098] 人类耐力、冲刺和抗阻训练的研究设计和方法。该研究招募了八名年轻健康男性。参与者年龄为 26.5 ± 3.7 岁, 体重正常 ($BMI 23.5 \pm 2.1 \text{kg/m}^2$), 不吸烟且不参加定期身体活动 (≤ 1 次/周), 健康水平为 $42.6 \pm 4.2 \text{ml/min/kg}$ 。在参与任何实验实践之前, 向受试者提供有关参与潜在风险的书面和口头信息。根据赫尔辛基II宣言, 从所有受试者获取知情内容书。该研究得到了丹麦地区伦理委员会的批准 (期刊编号:H-18051389)。经过一夜禁食 (禁食10小时) 后, 受试者于早上 (上午08:00) 到达测试设施。通过双能X射线吸收测定法 (Lunar DPX-IQ DEXA扫描仪, Lunar Corporation, WI, USA) 测量身体成分。通过在Monark Ergonomic 893E自行车 (Monark, Sweden) 上进行增量斜坡测试来测量最大氧气摄入 (VO_2 峰值), 以评估训练状态。测试包括100W下5分钟和150W下5分钟, 然后每分钟增加25W, 直至力竭。测试期间使用在线气体分析仪 (CareFusion, MasterScreen-CPX, Germany) 收集呼出的空气。在每次试验之前, 受试者被要求在至少48小时内避免剧烈身体活动。每次试验前一天, 按重量份给予标准化饮食 (60E%碳水化合物、25E%脂肪、15E%蛋白质)。能量需求的计算基于WHO公式 (“Human Energy Requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation.”, 2005) 和每日身体活动水平 (PAL)。实验当天早上, 受试者于上午08:00乘坐汽车或公共交通工具以禁食状态到达, 以避免多余的身体活动。将venflon导管 (BD Venflon™ Pro Safety, Helsingborg, Sweden) 插入肘前静脉, 以便在休息时、运动后立即 (0) 和运动恢复期间 (15、60、120和180分钟) 进行血液采样。离心后, 将血浆移入等份 ($200 \mu\text{l}$) 中并储存在 -80°C 直至进一步分析。所有受试者均接受了三项相同的实验试验, 这些试验仅以所进行的运动方式分开: 1) 耐力运动试验 (END), 2) 冲刺运动试验 (SPT) 和3) 抗阻运动试验 (RES)。试验以随机顺序进行, 每次试验至少间隔10天。耐力运动试验 (END)。END试验由55% VO_2 峰值的90分钟连续循环组成。尽管在试验期间进行了 VO_2 测量并进行了评估, 但负荷是在初步测试期间确定的, 以确保估计负荷引起55% VO_2 峰值, 并考虑运动期间 VO_2 的潜在漂移。如果出现负荷不足或过多的情况, 则进行调整。冲刺运动试验 (SPT)。SPT试验由50W下5分钟热身和随后在测力自行车上进行三轮30秒全力冲刺 (温盖特测试) 组成。每次温盖特测试均穿插5W下4分钟的主动恢复。抗阻运动试验 (RES)。RES试验基于双侧膝关节伸展运动。该试验从热身开始, 热身由3组各10次负荷相当于10-RM负荷的50%的重复动作组成。每组热身在组间穿插2分钟休息。热身后, 以相当于10-RM的负荷进行6组各10次的重复动作, 组间穿插2分钟休息。

[0099] 统计数据。除非另有说明, 所有数据均表示为平均值 \pm SEM。学生t检验用于成对比

较。除非另有说明,统计显著性设定为 $P < 0.05$ 。

[0100] 结果

[0101] 定期身体活动是一种强有力的干预措施,可以减少肥胖症并预防与肥胖症相关的代谢疾病(1-4)。相反,缺乏身体活动会增加患肥胖症和2型糖尿病的风险(5,6)。这些心脏代谢益处的程度与二甲双胍等一线药物疗法相当,在某些情况下甚至更大(7-9)。运动带来的心脏代谢益处的机制尚不完全清楚,但很可能不止于与活动相关的能量消耗的单独增加。

[0102] 身体活动代谢益处背后的一种内分泌机制是运动诱导的循环信号传导分子的产生。这些分泌因子被认为可以介导组织串扰,并作为身体活动代谢益处的分子传感器发挥作用(10)。使用候选方法,之前的研究已经确定了几种生物活性循环代谢物,它们在运动训练后介导脂肪和肌肉组织的有益重塑(11-14)。然而,系统地识别新代谢物的非靶向策略更有限。

[0103] 使用血浆的非靶向代谢组学,Lac-Phe(N-乳酰苯丙氨酸),一种以前未知功能的代谢物,在此被确定为小鼠和人类身体活动后最强烈诱导的循环代谢物之一。Lac-Phe在CNDP2+细胞(包括外周巨噬细胞和上皮细胞)中产生。功能获得和丧失的研究表明,Lac-Phe通过直接抑制食物摄入来抑制肥胖和肥胖症。最后,人类的冲刺、耐力和抗阻运动都会导致血浆中Lac-Phe水平急剧且持续升高。因此得出结论,Lac-Phe是一种运动诱导的信号代谢物,可介导身体活动的抗肥胖症作用。

[0104] 剧烈跑步机跑步显著增加小鼠体内的循环Lac-Phe

[0105] 为了以全面、公正的方式测量运动引起的循环代谢物,通过液相色谱-质谱法(LC-MS)对剧烈跑步机跑步后的小鼠进行乙腈/甲醇提取的血浆的非靶向代谢组分析(图1A)。在此运动方案中,跑步机的速度和坡度每三分钟增加一次,直到小鼠达到力竭(参见方法)。重要的是,非靶向代谢组学流程不需要先验了解检测到的峰的化学结构,从而能够对血浆中运动调节的变化进行更广泛和更公正的采样。正如预期的那样,之前在靶向质谱实验中检测到的代谢物会因身体活动而强烈增加,包括TCA循环的中间体(例如,琥珀酸、富马酸、苹果酸)以及核苷酸分解代谢的产物(例如,尿酸)。相对于静坐条件,运动时代谢组学数据集增加2至4倍(图1B和图7A)。在此代谢组学实验中检测到的7,752个峰中,统计上最显著的变化是质荷比(m/z)为236.0928且保留时间约为10.5分钟的未知峰(图1C)。相对于对照小鼠,该代谢物显著升高 >5 倍($P < 0.001$)。母体质量236.0928与分子式 $[C_{12}H_{14}NO_4]^-$ 一致,但这样的分子与现有数据库中任何明显的代谢物不匹配。

[0106] 为了确定这种运动诱发的代谢物的化学特性,进行了串联质谱实验,观察到了 $m/z = 88.040$ 的显著子离子。该子峰和质量损失(148.0532)分别与 $[C_3H_6NO_2]^-$ 和 $[C_9H_8O_2]$ 的分子式匹配(图1D)。根据这些片段谱,母体代谢物暂时指定为N-乳酰-苯丙氨酸,它是乳酸和苯丙氨酸的酰胺化缀合物(“Lac-Phe”,图1D)。通过化学合成生产的真实Lac-Phe标准品表现出与内源 $m/z = 236.0928$ 峰相同的MS/MS谱图(图1D)和保留时间(图7B),从而确认了结构指定。Lac-Phe水平的绝对定量显示的循环基础浓度和运动诱导浓度分别为 $0.5 \pm 0.4 \mu M$ 和 $2.7 \pm 0.9 \mu M$ (平均值 \pm SEM)。这些数据表明Lac-Phe是小鼠剧烈跑步机跑步后最强烈诱导的血浆代谢物之一。

[0107] Lac-Phe抑制食物摄入和肥胖症

[0108] Lac-Phe是一种研究较少、功能未知的代谢物。为了确定Lac-Phe是否在代谢稳态中发挥功能性作用,使用代谢室来确定急性Lac-Phe施用(50mg/kg,腹膜内[IP])对饮食诱导的肥胖(DIO)小鼠的影响。重要的是,这些实验是在一定剂量的Lac-Phe下进行的,因此峰值血浆浓度与单次运动训练后观察到的浓度相当(注射后30分钟的血浆水平,平均值 \pm SEM, $3.8\mu\text{M}\pm 1.9\mu\text{M}$)。如图2A所示,在施用后12小时时间段内,与媒介物处理的小鼠相比,急性Lac-Phe施用抑制了52%的食物摄入(平均值 \pm SEM,媒介物 $6.4\pm 0.6\text{kcal/小鼠}$;Lac-Phe $3.0\pm 1.0\text{kcal/小鼠}$)。重要的是,各组之间的走动活动没有差异(图2B),这表明食物摄入的抑制不仅仅是由于整体运动的减少。急性Lac-Phe处理不会改变氧气消耗(VO_2)、二氧化碳产量(VCO_2)或呼吸交换比(RER,图8A-C)。这些数据表明,对小鼠进行急性Lac-Phe施用可以特异性抑制能量摄入,而不改变能量消耗途径。

[0109] Lac-Phe长期减少食物摄入的能力有望减轻体重并改善葡萄糖和脂质稳态。为了直接检验这一假设,将Lac-Phe长期施用于DIO小鼠(50mg/kg/天,腹膜内[IP],每天一次,参见方法),并在10天时间段内监测食物摄入和体重的变化。正如预期的那样,与对照小鼠相比,长期接受Lac-Phe处理的动物表现出累积食物摄入减少(平均值 \pm SEM, Lac-Phe $2.1\pm 0.1\text{g/小鼠/天}$;媒介物 $2.9\pm 0.1\text{g/小鼠/天}$,图2C)。Lac-Phe处理的小鼠食物摄入的减少与体重的伴随减少有关(平均值 \pm SEM, $-2.8\pm 1.1\text{g}$,对应于总体重的-7%变化,图2D)。在第10天,进行了葡萄糖耐量测试,结果显示,与媒介物相比,用Lac-Phe处理的DIO小鼠的葡萄糖清除率有所改善(图2E)。对Lac-Phe处理小鼠的组织进行解剖发现,与媒介物处理的小鼠相比,脂肪组织质量显著减少,包括附睾脂肪(eWAT, -20%)、皮下腹股沟脂肪(iWAT, -41%)和棕色脂肪(BAT, -41%)库较小(图2F,G)。根据收获的其他器官的重量估计的总去脂体重不受影响(图2F)。

[0110] 接下来,进行了配对喂养实验,其中将食物限制在配对喂养组中,其水平与Lac-Phe处理小鼠消耗的水平相同(平均值 \pm SEM, 配对喂养 $1.8\pm 0.1\text{g/小鼠/天}$;对照 $2.5\pm 0.1\text{g/小鼠/天}$,相当于食物减少28%,图2H)。在这些条件下,对照配对喂养的小鼠表现出与用Lac-Phe处理的小鼠相同的体重变化(图2H),证实Lac-Phe对肥胖和肥胖症的影响是由于抑制食物摄入而不是由于活动或代谢率的任何变化。

[0111] 最后,探讨了Lac-Phe的抑制食欲和抗肥胖症作用所需的结构特征。值得注意的是,Lac-Phe由两个“半部分”:乳酸和苯丙氨酸组成。进行与上述相同的实验以直接比较Lac-Phe与乳酸和苯丙氨酸(50mg/kg,每天IP)。与对照小鼠相比,Lac-Phe再次抑制了食物摄入和体重(图2I)。相比之下,同等剂量的乳酸或苯丙氨酸施用在食物摄入和体重两方面与媒介物处理的小鼠相同(图2I)。这些数据证实,在模拟单次身体活动的剂量下,饮食诱导的肥胖小鼠中Lac-Phe的升高会抑制食物摄入,并以需要完整酰胺化缀合物的方式减少肥胖症。

[0112] 巨噬细胞的CNDP2和乳酸依赖性Lac-Phe分泌

[0113] 为了更好地了解Lac-Phe是如何产生的,首先要鉴定一种在体外表现出强大的Lac-Phe生物合成和分泌能力的细胞系。为此,在一组13个细胞系中,通过LC-MS/MS测量了条件培养基中分泌的Lac-Phe的水平。鼠巨噬细胞系RAW264.7被鉴定为将Lac-Phe强力地分泌到条件培养基中(图9A)。几乎所有的Lac-Phe都是由RAW264.7细胞分泌的;细胞内发现<1% (图3A)。相比之下,其他细胞内脂质(如花生四烯酸和油酸)的水平如预期在细胞裂解物

中富集(图9B)。检查的其他12个细胞系在条件培养基中表现出广泛的Lac-Phe水平,比从RAW264.7细胞观察到的水平低约50-90%(图9A)。因此,这些数据确定了培养中Lac-Phe从细胞的强力分泌,并进一步鉴定RAW264.7巨噬细胞作为研究该过程的模型细胞系。

[0114] 此前,一种名为CNDP2的胞质酶已显示可以在体外催化乳酸和苯丙氨酸缩合以生成Lac-Phe(图9C)(15)。然而,这种CNDP2催化反应的生理相关性和方向性此前尚未在更复杂的细胞和有机体环境中进行过评估。CNDP2-KO RAW264.7细胞使用CRISPR/Cas9生成,并使用抗CNDP2抗体验证CNDP2蛋白的损失(图3B)。如图3C所示,相对于对照细胞,CNDP2-KO中细胞外Lac-Phe水平降低>75%。原代腹膜巨噬细胞也从CNDP2-KO小鼠和对照WT小鼠获得(图3D)。与WT对照巨噬细胞相比,原代CNDP2-KO巨噬细胞的细胞外Lac-Phe水平再次降低>85%(图3E)。由于乳酸会通过运动而增加并且可以作为Lac-Phe的代谢前体,因此测试了细胞外乳酸是否可以通过质量作用类型的机制刺激Lac-Phe的产生。在高强度运动期间达到的浓度(25mM)下向条件培养基添加乳酸,可使RAW264.7细胞中Lac-Phe的细胞外水平增加+85%(图3F),并使原代巨噬细胞中的该水平增加+200%(图3G)。综上所述,这些数据表明CNDP2是细胞培养物中Lac-Phe产生的主要生物合成酶。这些数据还确定肌肉来源的乳酸是一种候选代谢前体,可在剧烈运动期间驱动Lac-Phe的产生(图3H)。

[0115] Lac-Phe生物合成的基因消除赋予对运动训练的抗肥胖症作用的抵抗

[0116] 接下来,CNDP2-KO小鼠被用作Lac-Phe基因消除的模型。首先,使用抗CNDP2抗体确定小鼠中CNDP2蛋白的组织表达。正如预期的那样,腹膜巨噬细胞表现出最高的CNDP2表达。在肾脏和肠中也检测到较低水平的CNDP2蛋白表达(图4A)。这些蛋白质水平数据与公开的微阵列数据一致,其显示巨噬细胞、肾脏和肠道中Cndp2表达富集(BioGPS)(16),也与公开的单细胞数据一致,所述公开的单细胞数据显示单核细胞和巨噬细胞中Cndp2表达富集(Tabula Muris)(17)。接下来在基础和跑步机跑步后条件下测量WT和CNDP2-KO小鼠中Lac-Phe的血浆水平。相对于WT对照动物,CNDP2-KO小鼠的循环Lac-Phe在基础和运动后条件下分别大幅减少>85%和>70%(图4B)。这些数据表明CNDP2是体内Lac-Phe的主要生物合成酶。伴随运动的Lac-Phe的残余增加可能反映了Lac-Phe生物合成的额外的、不依赖于CNDP2的途径。

[0117] 接下来评估WT和CNDP2-KO小鼠的食物摄入和肥胖症表型。由于Lac-Phe是通过运动训练诱导的,因此WT和CNDP2-KO小鼠经历结合长期跑步机跑步方案的高脂肪饮食(60% kcal来自脂肪)(参见方法)。WT小鼠和CNDP2-KO小鼠之间在本实验开始时的体重没有差异(平均值±SEM,WT,29.1±0.8g;CNDP2-KO,28.2±0.7g;P>0.05)。然而,从训练/致肥饮食方案的第10天开始,CNDP2-KO小鼠与对照小鼠相比开始表现出食物摄入增加(图4C)。这种增加的摄食行为一直持续到第40天实验结束。与这种摄食行为一致,与对照小鼠相比,CNDP2-KO小鼠也表现出越来越不同的体重,CNDP2-KO小鼠的最终体重比WT小鼠高出13%(平均值±SEM,WT,32.3±0.9g;CNDP2-KO,36.4±0.6g,图4D)。重要的是,该实验中的总跑步时间在各组之间是等同的(平均值±SEM,WT 41±1.2min/天;KO 41±1.7min/天)。最后,组织解剖显示,与对照相比,CNDP2-KO中的脂肪组织质量有所增加,而去脂质量相似(图4E,F)。从这些数据可以得出结论,消除Lac-Phe会导致运动训练期间能量摄入增加和体重增加。Lac-Phe直接作用于促食欲AgRP神经元和厌食欲POMC神经元

[0118] 大脑在调节食欲和体重方面发挥着重要作用。因此,使用全细胞膜片钳切片电生

理学来确定Lac-Phe直接对许多已知调节食物摄入的神经元群的影响。首先关注的是表达刺豚鼠相关肽(AgRP)和阿片黑皮素原(POMC)的神经元。这两个神经元群位于下丘脑弓状核(ARH)中,分别作为进食行为的中枢食欲驱动因素和厌食欲驱动因素的确立因素(18-24)。AgRP神经元的代表性电生理学记录如图5A所示。与体内食欲抑制作用一致,Lac-Phe(50 μ M)快速抑制促食欲AgRP神经元,放电频率降低和静息膜电位超极化证明了这一点(图5A)。Lac-Phe的抑制作用具有剂量响应性,在低至1 μ M的浓度下具有抑制活性,而1 μ M与循环中的生理水平相似(图5B,C)。此外,在存在TTX(钠通道阻滞剂)、DNQX(AMPA谷氨酸能受体拮抗剂)、D-AP5(NMDA谷氨酸能受体拮抗剂)和荷包牡丹碱(GABA_A受体拮抗剂)的情况下,Lac-Phe诱导的超极化持续存在(图5D)。定量显示,响应于在基线或抑制剂处理条件下测试的所有浓度的Lac-Phe,>70%的神经元发生超极化(抑制剂处理的效果的P>0.05,图5E)。这些结果表明Lac-Phe对AgRP神经元的抑制作用是经由直接作用介导而不是通过电路或突触前机制。

[0119] 还检查了Lac-Phe对厌食欲POMC+神经元的影响。Lac-Phe可以快速激活POMC神经元,如放电频率增加和去极化所示(图5F)。值得注意的是,Lac-Phe激活POMC神经元的作用不如Lac-Phe对AgRP神经元的抑制作用强,需要至少20 μ M的浓度(图5G,H)。Lac-Phe诱导的去极化在前面提到的抑制剂混合物存在的情况下持续存在,表明Lac-Phe对POMC神经元的刺激作用也是通过直接作用介导的(图5I,J)。

[0120] 最后,将这些切片电生理学研究扩展以探索Lac-Phe对其他两个神经群体的影响,这两个神经群体与喂养调节具有潜在的相关性(图10A-D)。没有观察到Lac-Phe对中缝背核(DRN)中血清素(5-HT)阳性神经元的兴奋性和下丘脑腹内侧核(VMH)的血清素生成因子1(SF1)阳性神经元的兴奋性产生影响,表明Lac-Phe以细胞类型特异性方式发挥作用。综上所述,可以得出结论,Lac-Phe可直接抑制脑切片中促食欲AgRP神经元并刺激促厌食欲POMC神经元。

[0121] 人运动后循环Lac-Phe的持续强劲升高

[0122] 为了确定人循环中的Lac-Phe是否也表现出运动诱导的升高,在两个独立的人运动队列中测量了Lac-Phe水平。首先,重新分析了先前发表的深度表型分析的剧烈跑步机跑步运动队列的非靶向血浆质谱数据(图6A)(25)。让这些人体(N=36)禁食过夜,然后通过跑步机跑步进行症状限制的心肺运动测试。该队列中58%为男性,年龄在40-75岁之间,平均BMI为28.4 \pm 0.9kg/m²(平均值 \pm SEM)。通过改良的胰岛素抑制试验确定的稳态血浆葡萄糖(SSPG)为153 \pm 67mg/dl(平均值 \pm SEM)。大多数参与者(86%)在峰值运动时超过呼吸交换比(RER)>1.05,而其余个体的心率达到其年龄调整的最大预测心率的>95%。来自该队列的所有血浆样品在之前都经过了深入的多组学谱分析(蛋白质组学、代谢组学、转录组学)。

[0123] 值得注意的是,在1,807种被分类为小分子代谢物、脂质或蛋白质的分析物中,对应于化学式与Lac-Phe(C₁₂H₁₄NO₄⁻)匹配的代谢物的尚未指定的峰在整个数据集中排名第三,最显著地由运动诱导(图6B)。串联质谱实验揭示了与真实的Lac-Phe标准品相比,具有特征m/z=88子离子(图11A)和相同保留时间(图11B)的片段谱。因此得出的结论是,这种先前未指定的、人运动诱发的代谢物是Lac-Phe。通过有这种结构指定,发现血浆Lac-Phe水平表现出强劲且持续的运动引起的升高,在运动后30分钟达到超过基线的4倍峰值,并持续超过运动后1小时(图6C)。相比之下,乳酸水平在运动停止时达到峰值,并在1小时内迅速恢复

到基线。在整个运动干预过程中,血浆苯丙氨酸水平基本没有变化(图11C)。在没有进行跑步机运动的对照个体队列中,Lac-Phe实际上在同一时间进程中略有下降,从而建立了人体中Lac-Phe的运动依赖性积累(图6C)。从这些数据可以得出结论,在跑步机剧烈跑步后,Lac-Phe也是人血浆中最强烈增加的代谢物之一。

[0124] 为了确定人运动后Lac-Phe升高的普遍性,测量了第二个人运动队列中的血浆Lac-Phe水平,该队列由在三个不同的运动试验中进行测试的个体组成(耐力、冲刺和抗阻(resistance),参见方法,图6D)。本研究招募了8名年龄 28.0 ± 1.3 岁(平均值 \pm SEM)和平均BMI $23.5 \pm 0.7 \text{ kg/m}^2$ (平均值 \pm SEM)的健康年轻男性。个体在运动试验前禁食,运动试验按随机顺序进行且间隔至少10天。耐力运动试验由峰值 VO_2 约为60%、90min的连续骑行组成;冲刺运动试验由在测力自行车上进行三轮30秒的全力冲刺(温盖特测试)组成;而抗阻运动试验由双侧膝关节伸展组成(6组,每组10次重复动作,负荷相当于10-RM)。在运动前和运动后的几个时间点收集血浆,并通过LC-MS/MS从乙腈/甲醇提取的血浆中测量Lac-Phe(图6E)。冲刺运动表现出血浆Lac-Phe积累最显著(运动后1小时达到8倍升高的峰值),其次是抗阻训练,然后是耐力训练。由于各种运动方式中的Lac-Phe升高幅度与乳酸的升高幅度相匹配(冲刺>抗阻>耐力,图11D),因此检查了Lac-Phe和乳酸水平之间的关系。如图6F所示,运动前与运动后立即相比,Lac-Phe和乳酸的倍数变化表现出强烈且接近线性的相关性(Pearson相关系数 $r=0.82, P<0.001$)。这些数据表明,不同的身体活动方式会导致人的循环Lac-Phe水平强劲且持续升高。

[0125] 讨论

[0126] 这里鉴定出一种由成为Lac-Phe的循环乳酸衍生代谢物介导的运动诱导抗肥胖症信号传导分子。小鼠的药理学功能获得和遗传功能丧失实验以及培养细胞研究提供了三方面证据,证明Lac-Phe是身体活动的抗肥胖症作用的重要循环分子:(1)Lac-Phe升高到剧烈运动期间达到的水平足以减少食物摄入和肥胖症;(2)小鼠体内Lac-Phe生物合成的基因消除使得对运动训练的抗肥胖症作用产生抵抗力;和(3)Lac-Phe直接调节先前建立的用于调节体外摄食行为的神经元的兴奋性。进一步支持这些发现的是,Lac-Phe被认为是人类进行不同身体活动方式后血浆中最强烈诱导的分子变化之一。

[0127] 费力运动已被充分证明可以严重抑制小鼠的食物摄入,这种行为表型分别与AgRP和POMC神经元的神经元活动的运动后抑制和刺激相关(26-28)。虽然包括生长素释放肽在内的特定候选分子被认为有助于这些作用,但其他运动诱导信号传导分子对这些食物摄入途径的作用仍然知之甚少。数据表明Lac-Phe是一种运动诱导分子,在调节摄食行为的这些关键中央途径的上游发挥作用。对于人类来说,运动对食欲和食物摄入的影响更为复杂,取决于研究队列以及身体活动的类型、持续时间或强度(29-31)。这些人类数据可以解释为,除了Lac-Phe之外,运动还可能诱导产生其他目前未知的食欲调节分子。

[0128] 作为肥胖症和食物摄入的循环调节剂,与其他外周源性食欲调节激素相比,Lac-Phe既有相似之处,也有重要差异。Lac-Phe与许多其他肽激素(包括GLP-1、GDF15、CCK、PYY和瘦素)一样抑制进食行为。Lac-Phe和GDF15二者都是由相似的细胞类型和解剖位置产生和分泌的,包括巨噬细胞、肠和肾脏(32,33)。然而,也存在重要的差异。例如,运动诱导的Lac-Phe显著、强劲和持续的升高似乎是该分子所独有的,这与其他外周衍生的肽激素形成对比,其他外周衍生的肽激素主要受营养物质调节并且即使因身体活动有变化也只是适度

变化(34-36)。此外,Lac-Phe是一种代谢物(MW约250DA),而其他食欲激素是更大的多肽(例如,GLP-1,MW约3000DA)或蛋白质(例如,GDF15,MW约15kDA)。

[0129] 目前对Lac-Phe产生和调节的研究也提供了关于身体活动的生理响应背后的细胞和生化机制的令人惊讶的见解。首先,肌细胞和肌肉组织作为身体活动的循环分子传感器的来源一直是历史上的焦点(37-39)。巨噬细胞和其他CNDP2+细胞类型产生并分泌Lac-Phe,这表明许多其他细胞类型可以感知身体活动并对其做出响应(13,40)。这些其他运动响应性细胞类型的潜在共同点可能是它们直接检测或以其他方式导入肌肉来源乳酸的能力。其次,该乳酸作为Lac-Phe生物合成的代谢前体,为运动期间Lac-Phe的强劲升高提供了回路和生化逻辑:即,该运动诱导收缩肌肉分泌乳酸,并迅速导入CNDP2+细胞类型,然后以酰胺化Lac-Phe形式重新输出到循环中。乳酸的替代代谢衍生化原则上也可以构成其他未被发现的运动诱导信号传导分子。第三,即使在乳酸回到基线水平的时间点,Lac-Phe也表现出强劲和持续的升高,这表明乳酸的生化衍生化作为有机体第二信使系统发挥作用,其中乳酸传感与持久的内分泌信号传导相结合。循环中Lac-Phe的持续升高可能部分反映了这样一个事实:与乳酸不同,Lac-Phe不能直接重新并入初级代谢途径。

[0130] 最后,身体活动的好处不仅仅限于代谢健康。在脑部中,运动能增强情绪,减少焦虑和抑郁,并预防痴呆和其他神经退行性疾病(41-43)。通过对神经元表现出直接作用,Lac-Phe代表了介导其中一些额外益处的有吸引力的候选因子。因此,Lac-Phe途径的药理学靶向可能有助于治疗肥胖症和这些其他神经系统疾病。

[0131] 参考文献

[0132] 1.K.F.Eriksson,F. **Lindgårde**,Prevention of Type 2(non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise.Diabetologia.34,891-898 (1991).

[0133] 2.X.-R.Pan,G.-W.Li,J.-X.Wang,W.-Y.Yang,Z.-X.An,Z.-X.Hu,Juan-Lin,J.-Z.Xiao,H.-B.Cao,P.-A.Liu,X.-G.Jiang,Y.-Y.Jiang,J.-P.Wang,H.Zheng,H.Zhang,P.H.Bennett,B.V.Howard,Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance.The Da Qing IGT and Diabetes Study.Diabetes Care.20,537-544(1997).

[0134] 3.W.J.Rejeski,E.H.Ip,A.G.Bertoni,G.A.Bray,G.Evans,E.W.Gregg,Q.Zhang,Lifestyle Change and Mobility in Obese Adults with Type 2Diabetes.N.Engl.J.Med.366,1209-1217(2012).

[0135] 4.M.J.Stampfer,F.B.Hu,J.E.Manson,E.B.Rimm,W.C.Willet,Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle.N.Engl.J.Med.343,16-22(2000).

[0136] 5.S.P.Helmrich,D.R.Ragland,R.W.Leung,R.S.Paffenbarger,Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus.New English J.Med.325,147-152(1991).

[0137] 6.A.Rawshani,A.Rawshani,S.Franzén,N.Sattar,B.Eliasson,A.-M.Svensson,B.Zethelius,M.Miftaraj,D.K.McGuire,A.Rosengren,S. **Gudbjörnsdottir**,Risk Factors, Mortality,and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type

2Diabetes.N.Engl.J.Med.379,633-644(2018) .

[0138] 7.H.Naci,M.Salcher-Konrad,S.Dias,M.R.Blum,S.A.Sahoo,D.Nunan,J.P.A.Ioannidis,How does exercise treatment compare with antihypertensive medications?A network meta-analysis of 391randomised controlled trials assessing exercise and medication effects on systolic blood pressure.Br.J.Sports Med.53(2019) ,pp.859-869.

[0139] 8.W.C.Knowler,E.Barrett-Connor,S.E.Fowler,R.F.Hamman,J.M.Lachin,E.A.Walker,D.M.Nathan,D.P.P.R.Group,Reduction of the incidence of type 2diabetes with lifestyle intervention or metformin.N.Engl.J.Med.346,393-403 (2002) .

[0140] 9.Diabetes Prevention Program Research Group,W.C.Knowler,S.E.Fowler,R.F.Hamman,C.A.Christophi,H.J.Hoffman,A.T.Brenneman,J.O.Brown-Friday,R.Goldberg,E.Venditti,D.M.Nathan,10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study.Lancet.374, 1677-1686(2009) .

[0141] 10.J.A.Sanford,C.D.Nogiec,M.E.Lindholm,J.N.Adkins,D.Amar,S.Dasari,J.K.Drugin,F.M.Fernández,S.Radom-Aizik,S.Schenk,M.P.Snyder,R.P.Tracy,P.Vanderboom,S.Trappe,M.J.Walsh,T.M.T.of P.A.Consortium,MolecularTransducers of Physical Activity Consortium(MoTrPAC):Mapping the Dynamic Responses to Exercise.Cell.181,1464-1474(2020) .

[0142] 11.L.D.Roberts,P. **Boström**,J.F.O' Sullivan,R.T.Schinzal,G.D.Lewis,A.Dejam,Y.-K.Lee,M.J.Palma,S.Calhoun,A.Georgiadi,M.-H.Chen,V.S.Ramachandran,M.G.Larson,C.Bouchard,T.Rankinen,A.L.Souza,C.B.Clish,T.J.Wang,J.L.Estall,A.A.Soukas,C.A.Cowan,B.M.Spiegelman,R.E.Gerszten, β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors.Cell Metab.19,96-108(2014) .

[0143] 12.K.I.Stanford,M.D.Lynes,H.Takahashi,L.A.Baer,P.J.Arts,F.J.May,A.C.Lehnig,R.J.W.Middelbeek,J.J.Richard,K.So,E.Y.Chen,F.Gao,N.R.Narain,G.Distefano,V.K.Shettigar,M.F.Hirshman,M.T.Ziolo,M.A.Kiebish,Y.H.Tseng,P.M.Coen,L.J.Goodyear,12,13-diHOME:An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake.Cell Metab.27,1111-1120.e3(2018) .

[0144] 13.A.Reddy,L.H.M.Bozi,O.K.Yaghi,E.L.Mills,H.Xiao,H.E.Nicholson,M.Paschini,J.A.Paulo,R.Garrity,D.Laznik-Bogoslavski,J.C.B.Ferreira,C.S.Carl,K.A. **Sjöberg**,J.F.P.Wojtaszewski,J.F.Jeppesen,B.Kiens,S.P.Gygi,E.A.Richter,D.Mathis,E.T.Chouchani,pH-Gated Succinate Secretion Regulates Muscle Remodeling in Response to Exercise.Cell.183,62-75.e17(2020) .

[0145] 14.Y.Yuan,P.Xu,Q.Jiang,X.Cai,T.Wang,W.Peng,J.Sun,C.Zhu,C.Zhang,D.Yue,Z.He,J.Yang,Y.Zeng,M.Du,F.Zhang,L.Ibrahimi,S.Schaul,Y.Jiang,J.Wang,J.Sun,Q.Wang,L.Liu,S.Wang,L.Wang,X.Zhu,P.Gao,Q.Xi,C.Yin,F.Li,G.Xu,Y.Zhang,G.Shu,

Exercise-induced α -ketoglutaric acid stimulates muscle hypertrophy and fat loss through OXGR1-dependent adrenal activation. *EMBO J.* 39, e103304 (2020).

[0146] 15. R. S. Jansen, R. Addie, R. Merkx, A. Fish, S. Mahakena, O. B. Bleijerveld, M. Altelaar, L. IJlst, R. J. Wanders, P. Borst, K. Van De Wetering, N-lactoyl-amino acids are ubiquitous metabolites that originate from CNDP2-mediated reverse proteolysis of lactate and amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 6601-6606 (2015).

[0147] 16. C. Wu, C. Orozco, J. Boyer, M. Leglise, J. Goodale, S. Batalov, C. L. Hodge, J. Haase, J. Janes, J. W. Huss, A. I. Su, BioGPS: An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 10, R130 (2009).

[0148] 17. The Tabula Muris Consortium, Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature.* 562, 367-372 (2018).

[0149] 18. J. -W. Sohn, J. K. Elmquist, K. W. Williams, Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci.* 36, 504-512 (2013).

[0150] 19. M. J. Krashes, S. Koda, C. P. Ye, S. C. Rogan, A. C. Adams, D. S. Cusher, E. Maratos-Flier, B. L. Roth, B. B. Lowell, Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1424-1428 (2011).

[0151] 20. S. Luquet, F. A. Perez, T. S. Hnasko, R. D. Palmiter, NPY/AgRP neurons are essentials for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* (80-). 310, 683-685 (2005).

[0152] 21. Y. Aponte, D. Atasoy, S. M. Sternson, AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14, 351-355 (2011).

[0153] 22. G. J. Morton, D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh, M. W. Schwartz, Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 443, 289-295 (2006).

[0154] 23. Y. Xu, J. K. Elmquist, M. Fukuda, Central nervous control of energy and glucose balance: Focus on the central melanocortin system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1243, 1-14 (2011).

[0155] 24. C. Zhan, J. Zhou, Q. Feng, J. en Zhang, S. Lin, J. Bao, P. Wu, M. Luo, Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J. Neurosci.* 33, 3624-3632 (2013).

[0156] 25. K. Contrepois, S. Wu, K. J. Moneghetti, D. Hornburg, S. Ahadi, M. S. Tsai, A. A. Metwally, E. Wei, B. Lee-McMullen, J. V. Quijada, S. Chen, J. W. Christle, M. Ellenberger, B. Balliu, S. Taylor, M. G. Durrant, D. A. Knowles, H. Choudhry, M. Ashland, A. Bahmani, B. Enslin, M. Amsallem, Y. Kobayashi, M. Avina, D. Perelman, S. M. Schüssler-Fiorenza Rose, W. Zhou, E. A. Ashley, S. B. Montgomery, H. Chaib, F. Haddad, M. P. Snyder, Molecular Choreography of Acute Exercise. *Cell.* 181, 1112-1130. e16 (2020).

- [0157] 26. B. K. Mani, C. M. Castorena, S. Osborne-Lawrence, P. Vijayaraghavan, N. P. Metzger, J. K. Elmquist, J. M. Zigman, Ghrelin mediates exercise endurance and the feeding response post-exercise. *Mol. Metab.* 9, 114-130 (2018).
- [0158] 27. M. C. Miletta, O. Iyilikci, M. Shanabrough, M. Šestan-Peša, A. Cammisa, C. J. Zeiss, M. O. Dietrich, T. L. Horvath, AgRP neurons control compulsive exercise and survival in an activity-based anorexia model. *Nat. Metab.* 2, 1204-1211 (2020).
- [0159] 28. Z. He, Y. Gao, A. L. Alhadeff, C. M. Castorena, Y. Huang, L. Lieu, S. Afrin, J. Sun, J. N. Betley, H. Guo, K. W. Williams, Cellular and synaptic reorganization of arcuate NPY/AgRP and POMC neurons after exercise. *Mol. Metab.* 18, 107-119 (2018).
- [0160] 29. K. Beaulieu, M. Hopkins, J. Blundell, G. Finlayson, Homeostatic and non-homeostatic appetite control along the spectrum of physical activity levels: An updated perspective. *Physiol. Behav.* 192, 23-29 (2018).
- [0161] 30. K. Deighton, R. Barry, C. E. Connon, D. J. Stensel, Appetite, gut hormone and energy intake responses to low volume sprint interval and traditional endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 113, 1147-1156 (2013).
- [0162] 31. J. Dorling, D. R. Broom, S. F. Burns, D. J. Clayton, K. Deighton, L. J. James, J. A. King, M. Miyashita, A. E. Thackray, R. L. Batterham, D. J. Stensel, Acute and chronic effects of exercise on appetite, energy intake, and appetite-related hormones: The modulating effect of adiposity, sex, and habitual physical activity. *Nutrients.* 10, 1140 (2018).
- [0163] 32. A. P. Coll, M. Chen, P. Taskar, D. Rimmington, S. Patel, J. A. Tadross, I. Cimino, M. Yang, P. Welsh, S. Virtue, D. A. Goldspink, E. L. Miedzybrodzka, A. R. Konopka, R. R. Esponda, J. T. J. Huang, Y. C. L. Tung, S. Rodriguez-Cuenca, R. A. Tomaz, H. P. Harding, A. Melvin, G. S. H. Yeo, D. Preiss, A. Vidal-Puig, L. Vallier, K. S. Nair, N. J. Wareham, D. Ron, F. M. Gribble, F. Reimann, N. Sattar, D. B. Savage, B. B. Allan, S. O' Rahilly, GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature.* 578, 444-448 (2020).
- [0164] 33. S. C. A. De Jager, B. Bermúdez, I. Bot, R. R. Koenen, M. Bot, A. Kavelaars, V. De Waard, C. J. Heijnen, F. J. G. Muriana, C. Weber, T. J. C. Van Berkel, J. Kuiper, S. J. Lee, R. Abia, E. A. L. Biessen, Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis. *J. Exp. Med.* 208, 217-225 (2011).
- [0165] 34. M. Kleinert, C. Clemmensen, K. A. Sjöberg, C. S. Carl, J. F. Jeppesen, J. F. P. Wojtaszewski, B. Kiens, E. A. Richter, Exercise increases circulating GDF15 in humans. *Mol. Metab.* 9, 187-191 (2018).
- [0166] 35. C. Martins, L. M. Morgan, S. R. Bloom, M. D. Robertson, Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. *J. Endocrinol.* 193, 251-258 (2007).
- [0167] 36. S. Vatansever-Ozen, G. Tiryaki-Sonmez, G. Bugdayci, G. Ozen, The effects of exercise on food intake and hunger: Relationship with acylated ghrelin and

leptin. J. Sport. Sci. Med. 10, 283-291 (2011).

[0168] 37. B. S. and B. K. P. Adam Steensberg, Gerrit van Hall, Takuya Osada, Massimo Sacchetti, Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. J. Physiol. 529, 237-242 (2000).

[0169] 38. R. R. Rao, J. Z. Long, J. P. White, K. J. Svensson, J. Lou, I. Lokurkar, M. P. Jedrychowski, J. L. Ruas, C. D. Wrann, J. C. Lo, D. M. Camera, J. Lachey, S. Gygi, J. Seehra, J. A. Hawley, B. M. Spiegelman, Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. Cell. 157, 1279-1291 (2014).

[0170] 39. P. **Boström**, J. Wu, M. P. Jedrychowski, A. Korde, L. Ye, J. C. Lo, K. A. Rasbach, E. A. **Boström**, J. H. Choi, J. Z. Long, S. Kajimura, M. C. Zingaretti, B. F. Vind, H. Tu, S. Cinti, K. **Höjlund**, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman, A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. 481, 463-468 (2012).

[0171] 40. B. Ingerslev, J. S. Hansen, C. Hoffmann, J. O. Clemmesen, N. H. Secher, M. Scheler, M. **Hraběde Angelis**, H. U. **Häring**, B. K. Pedersen, C. Weigert, P. Plomgaard, Angiopoietin-like protein 4 is an exercise-induced hepatokine in humans, regulated by glucagon and cAMP. Mol. Metab. 6, 1286-1295 (2017).

[0172] 41. A. M. Horowitz, X. Fan, G. Bieri, L. K. Smith, C. I. Sanchez-Diaz, A. B. Schroer, G. Gontier, K. B. Casaletto, J. H. Kramer, K. E. Williams, S. A. Villeda, Blood factors transfer beneficial effects of exercise on neurogenesis and cognition to the aged brain. Science (80-.). 369, 167-173 (2020).

[0173] 42. S. Norton, F. E. Matthews, D. E. Barnes, K. Yaffe, C. Brayne, Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. Lancet Neurol. 13, 788-794 (2014).

[0174] 43. M. Hamer, Y. Chida, Physical activity and risk of neurodegenerative disease: A systematic review of prospective evidence. Psychol. Med. 39, 3-11 (2009).

[0175] 尽管有所附的权利要求,本公开还由以下条目限定:

[0176] 1. 一种治疗受试者的代谢病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的N-乳酰-氨基酸。

[0177] 2. 根据条目1所述的方法,其中所述N-乳酰-氨基酸为N-乳酰-苯丙氨酸。

[0178] 3. 根据条目1-2中的任一项所述的方法,其中所述有效量包括当施用产生与身体活动后所观察到的所述N-乳酰-氨基酸的血浆浓度相当的所述N-乳酰-氨基酸的血浆浓度的所述N-乳酰-氨基酸的量。

[0179] 4. 根据条目1-3中的任一项所述的方法,其中所述有效量的范围为从1mg/kg至500mg/kg。

[0180] 5. 根据条目1-4中的任一项所述的方法,其中所述有效量在1天至60天范围的时间

段内每天施用一次。

[0181] 6. 根据条目1-5中的任一项所述的方法,其中所述代谢病症为肥胖症。

[0182] 7. 根据条目1-6中的任一项所述的方法,其中所述代谢病症为肥胖症相关的代谢病症。

[0183] 8. 根据条目1-7中的任一项所述的方法,其中所述代谢病症为糖尿病。

[0184] 9. 根据条目1-8中的任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的食物摄入与所述受试者在治疗前的食物摄入相比减少。

[0185] 10. 根据条目9所述的方法,其中累积食物摄入减少10%至90%。

[0186] 11. 根据条目9-10中的任一项所述的方法,其中平均每日食物摄入减少10%至90%。

[0187] 12. 根据条目1-11中的任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的体重与所述受试者在治疗前的体重相比减轻。

[0188] 13. 根据条目12所述的方法,其中体重减轻1%至50%。

[0189] 14. 根据条目1-13中的任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的葡萄糖稳态与所述受试者在治疗前的葡萄糖稳态相比改善。

[0190] 15. 根据条目1-14中的任一项所述的方法,其中所述方法使所述受试者的葡萄糖清除率与所述受试者在治疗前的葡萄糖清除率相比改善。

[0191] 16. 根据条目15所述的方法,其中葡萄糖清除率改善1%至50%。

[0192] 17. 根据条目1-16中的任一项所述的方法,其中所述方法使脂肪组织质量与所述受试者在治疗前的脂肪组织质量相比减少。

[0193] 18. 根据条目17所述的方法,其中所述方法使棕色脂肪减少30%至50%。

[0194] 19. 根据条目1-18中的任一项所述的方法,其中所述受试者为成年的。

[0195] 20. 根据条目1-19中的任一项所述的方法,其中所述受试者为哺乳动物。

[0196] 21. 根据条目1-20中的任一项所述的方法,其中所述受试者为人。

[0197] 22. 根据条目1-21中的任一项所述的方法,其中所述施用包括口服施用。

[0198] 23. 根据条目1-22中的任一项所述的方法,其中所述施用包括肠胃外施用。

[0199] 24. 根据条目1-23中的任一项所述的方法,其中所述施用包括腹膜内施用。

[0200] 25. 根据条目1-24中的任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述N-乳酰-氨基酸与用于治疗所述代谢病症的一种或更多种疗法组合施用。

[0201] 26. 根据条目25所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括用于治疗所述代谢病症的活性剂。

[0202] 27. 根据条目25-26中的任一项所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括身体活动。

[0203] 28. 根据条目25-27中的任一项所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括低热量饮食。

[0204] 29. 根据条目25-28中的任一项所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括手术干预。

[0205] 30. 根据条目25-29中的任一项所述的方法,其中所述一种或更多种疗法包括使用减重装置。

- [0206] 31.一种药物制剂,包含:
- [0207] 有效治疗代谢病症的量的N-乳酰-氨基酸;和
- [0208] 赋形剂。
- [0209] 32.根据条目31所述的药物制剂,其中所述N-乳酰-氨基酸为N-乳酰-苯丙氨酸。
- [0210] 33.根据条目31-32中的任一项所述的药物制剂,其中所述有效量的范围为从1mg/kg至500mg/kg。
- [0211] 34.根据条目31-33中的任一项所述的药物制剂,其中所述药物制剂为胶囊或片剂。
- [0212] 35.根据条目31-33中的任一项所述的药物制剂,其中所述药物制剂为肠胃外制剂。
- [0213] 36.根据条目31-33中的任一项所述的药物制剂,其中所述药物制剂为腹膜内制剂。
- [0214] 在至少一些先前描述的实施方案中,在一个实施方案中使用的一个或更多个元素可以可互换地在另一个实施方案中使用,除非这样的替换在技术上不可行。本领域技术人员应当理解,在不脱离所要求保护的的主题的范围的情况下,可以对上述方法和结构进行各种其他省略、添加和修改。所有这样的修改和改变旨在落入由所附权利要求限定的主题的范围之内。
- [0215] 本领域技术人员应当理解,一般来说,本文中使用的术语,尤其是所附权利要求(例如,所附权利要求的主体)中使用的术语通常旨在作为“开放”术语(例如,术语“包括”应解释为“包括但不限于”,术语“具有”应解释为“至少具有”,术语“包含”应解释为“包含但不限于”,等等)。本领域技术人员还应当理解,如果意图是特定数目的引入的权利要求叙述,那么将在权利要求中明确地叙述这样的意图,并且在没有这样的叙述的情况下,不存在这样的意图。例如,为了帮助理解,以下所附权利要求可以含有使用介绍性短语“至少一个”和“一个或更多个”来引入权利要求叙述。然而,此类短语的使用不应被解释为暗示,通过不定冠词“一”或“一个”引入权利要求叙述将含有此类引入的权利要求叙述的任何特定权利要求限制为仅包含一个此类叙述的实施方案,即使当同一权利要求包括介绍性短语“一个或更多个”或“至少一个”以及不定冠词诸如“一”或“一个”(例如,“一”和/或“一个”应解释为表示“至少一个”或“一个或更多个”);这同样适用于使用定冠词来引入权利要求叙述的情况。另外,即使明确记载了所引入的权利要求叙述的具体数目,本领域技术人员将认识到,这样的叙述应当被解释为至少表示所叙述的数目(例如,不带其他修饰语的单纯叙述“两个叙述物”是指至少两个叙述物,或者两个或更多个叙述物)。此外,在使用类似于“A、B和C等中的至少一个”的惯例的那些情况下,一般来说,这样的构造意在为本领域技术人员将理解该惯例的意涵(例如,“具有A、B和C中的至少一个的系统”将包括但不限于以下系统:单独A、单独B、单独C、A和B一起、A和C一起、B和C一起、和/或A、B和C一起等)。此外,在那些使用类似于“A、B或C等中的至少一个”的惯例的情况下,一般来说,这样的构造意在为本领域技术人员将理解惯例的意涵(例如,“具有A、B或C中的至少一个的系统”将包括但不限于以下系统:单独A、单独B、单独C、A和B一起、A和C一起、B和C一起、和/或A、B和C一起等)。本领域技术人员还应理解,实际上任何呈现两个或多个备选术语的转折词和/或短语,无论是在说明书、权利要求书还是附图中,都应被理解为考虑包括术语之一、任一项术语或两项术语的可能

性。例如,短语“A或B”将被理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能性。

[0216] 另外,在根据马库什组描述本公开内容的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本公开内容也因此根据马库什组的任何个体成员或成员子组来描述。

[0217] 如本领域技术人员将理解的,出于任何和所有目的,例如就提供书面描述而言,本文公开的所有范围还涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可以容易地被认为是充分描述的并且使得相同的范围能够被分解成至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性示例,本文讨论的每个范围可以容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员还可以理解的,所有诸如“直到”、“至少”、“大于”、“小于”和类似的语言包括所列举的数字并指随后可被分解为如上所述的子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个物品的组是指具有1、2或3个物品的组。类似地,具有1-5个物品的组是指具有1、2、3、4或5个物品的组,诸如此类。

[0218] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和示例的方式对前述发明进行了一些详细的描述,但是根据本发明的教导,对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,可以进行某些改变和修改而不脱离所附权利要求的精神或范围。

[0219] 因此,前述内容仅说明本发明的原理。应当理解,本领域技术人员将能够想到各种布置,尽管本文没有明确描述或示出,但是这些布置体现了本发明的原理并且被包括在其精神和范围内。此外,本文记载的所有示例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理以及发明人为促进本领域而贡献的概念,并且应被解释为不限于此类具体记载的实例和条件。此外,本文中记载本发明的原理、方面和实施方案及其具体示例的所有陈述旨在涵盖其结构和功能等同物。另外,这样的等同物旨在包括当前已知的等同物和未来开发的等同物,即,无论结构如何,所开发的执行相同功能的任何元素。此外,本文所公开的任何内容均不旨在献给公众,无论此类公开内容是否在权利要求中明确记载。

[0220] 因此,本发明的范围并不旨在限于本文所示和描述的实例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求体现。在权利要求中,35U.S.C. §112 (F) 或35U.S.C. §112 (6) 被明确定义为仅当确切的短语“用于……的装置(means for)”或确切的短语“用于……的步骤(step for)”记载于权利要求中的某限定的开头时才被援引用于权利要求中的此类限定;如果权利要求中的限定中未使用此类确切的短语,则不援引35U.S.C. §112 (F) 或35U.S.C. §112 (6)。

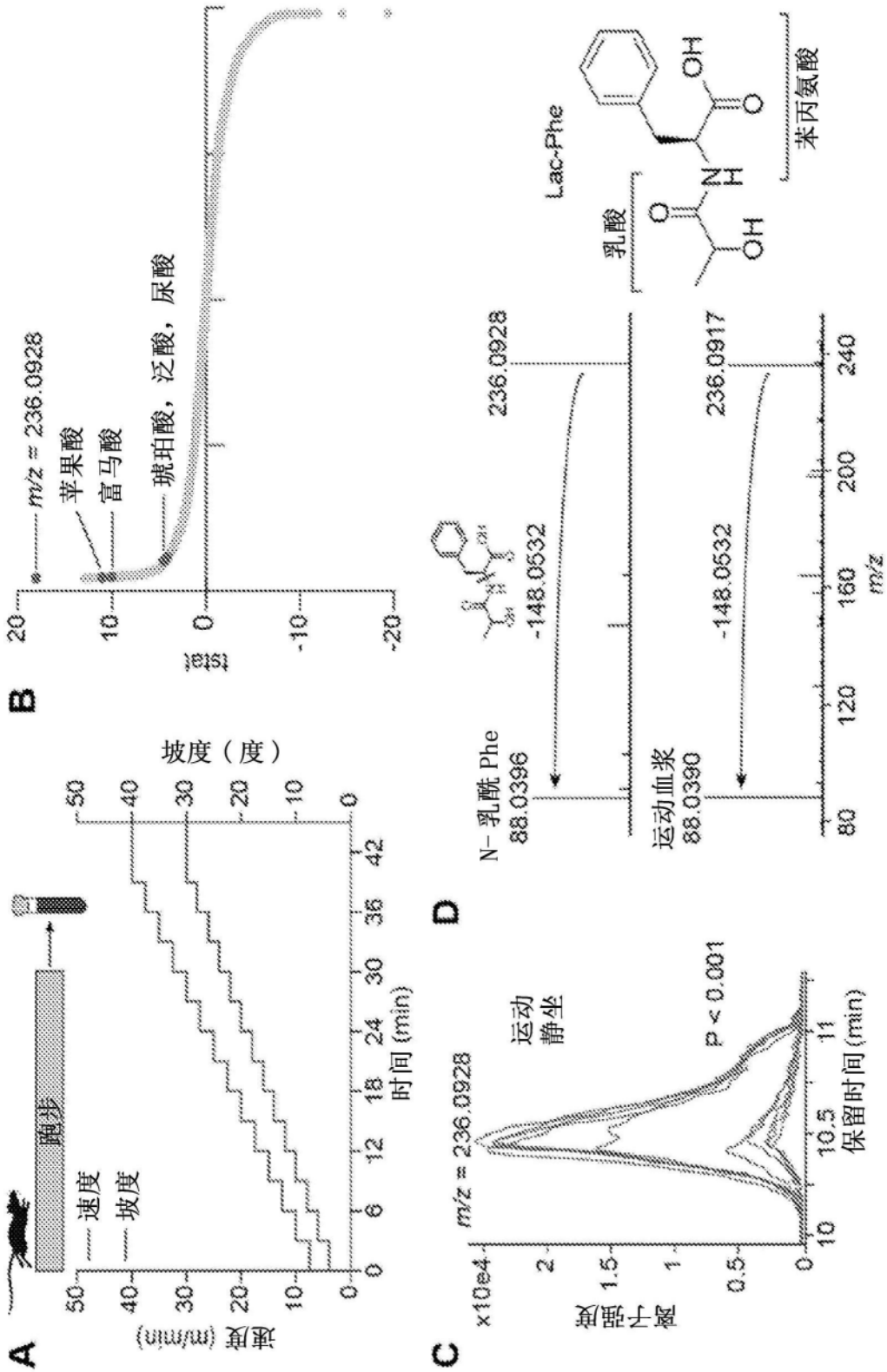


图1

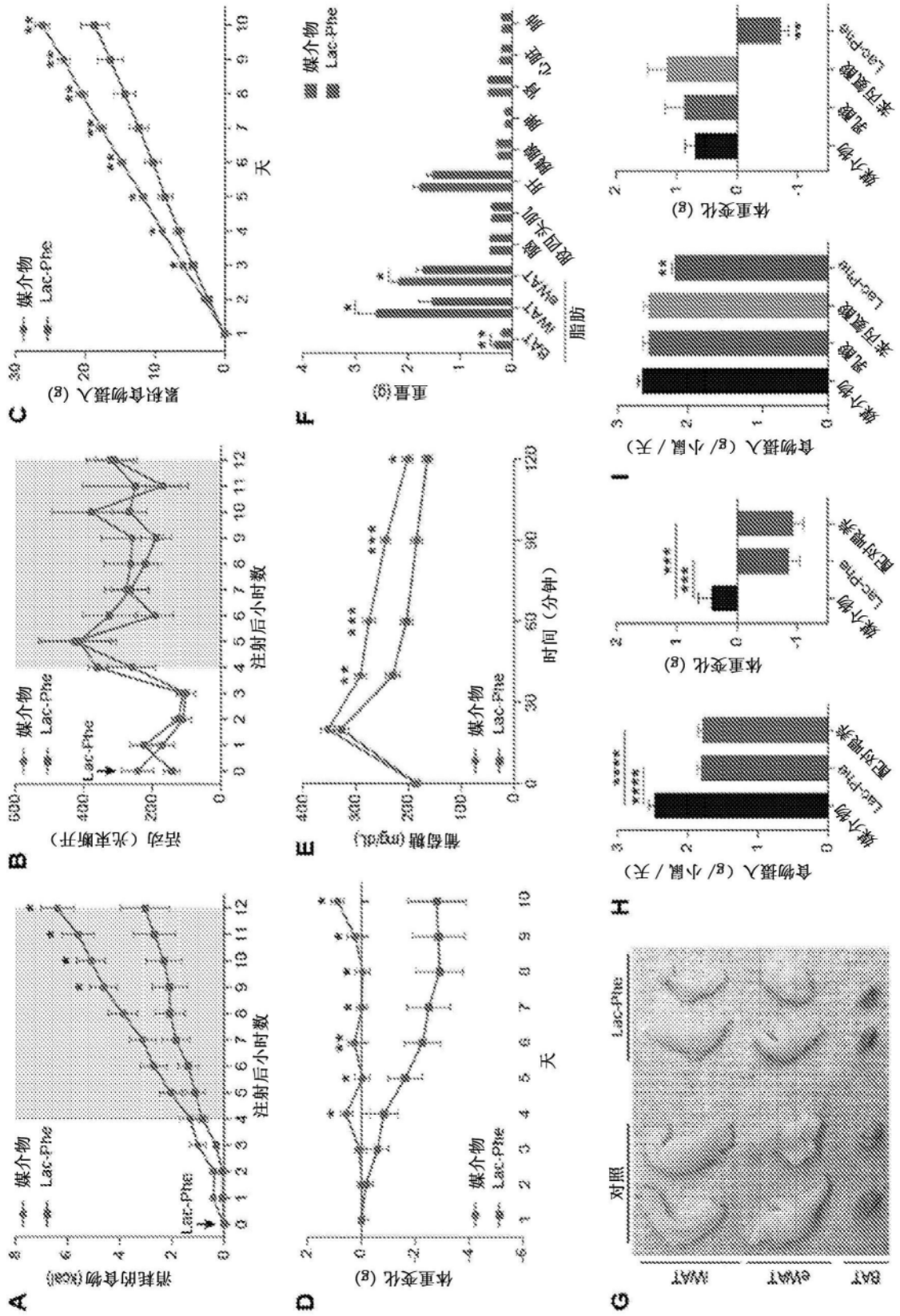


图2

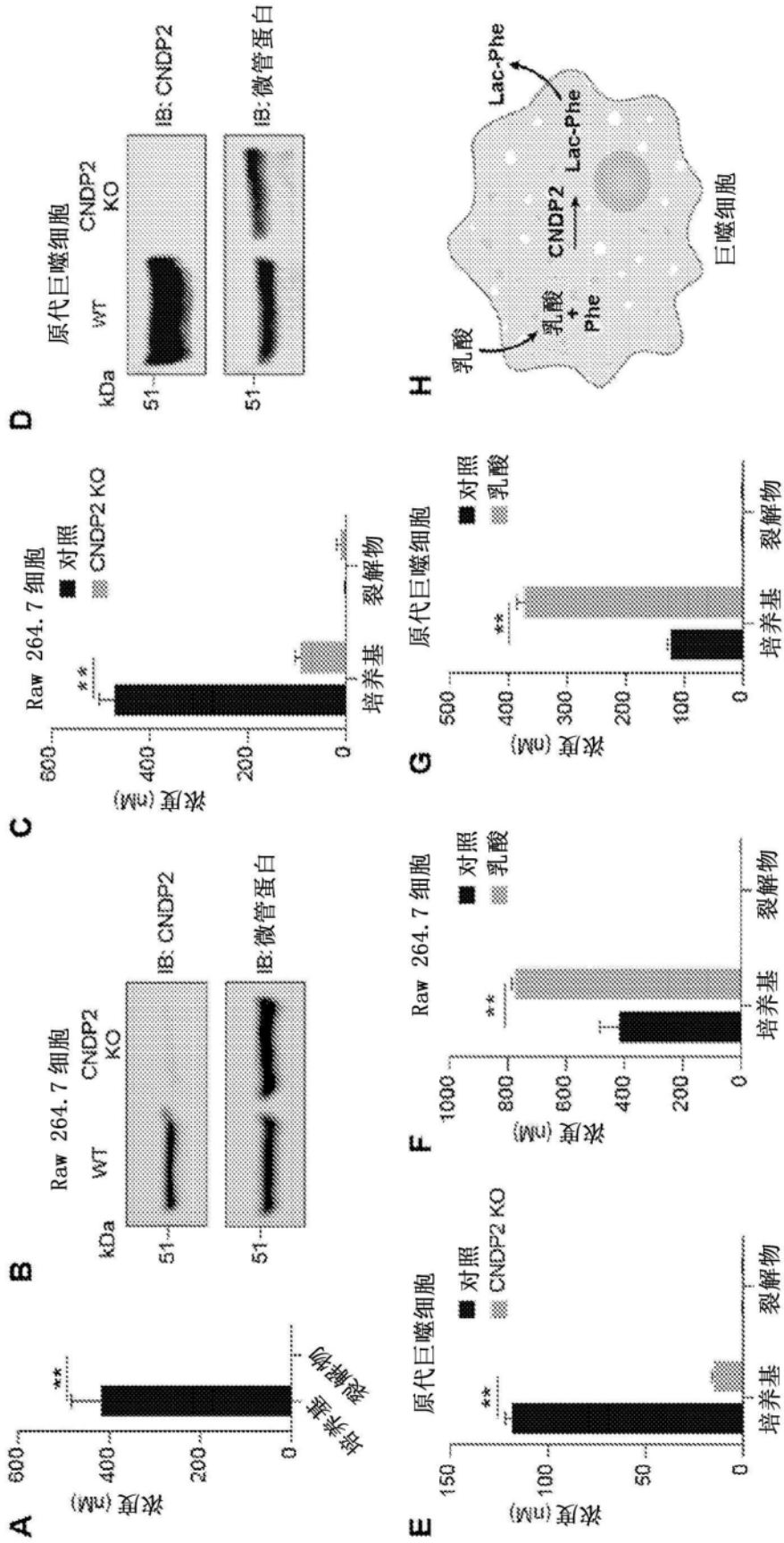


图3

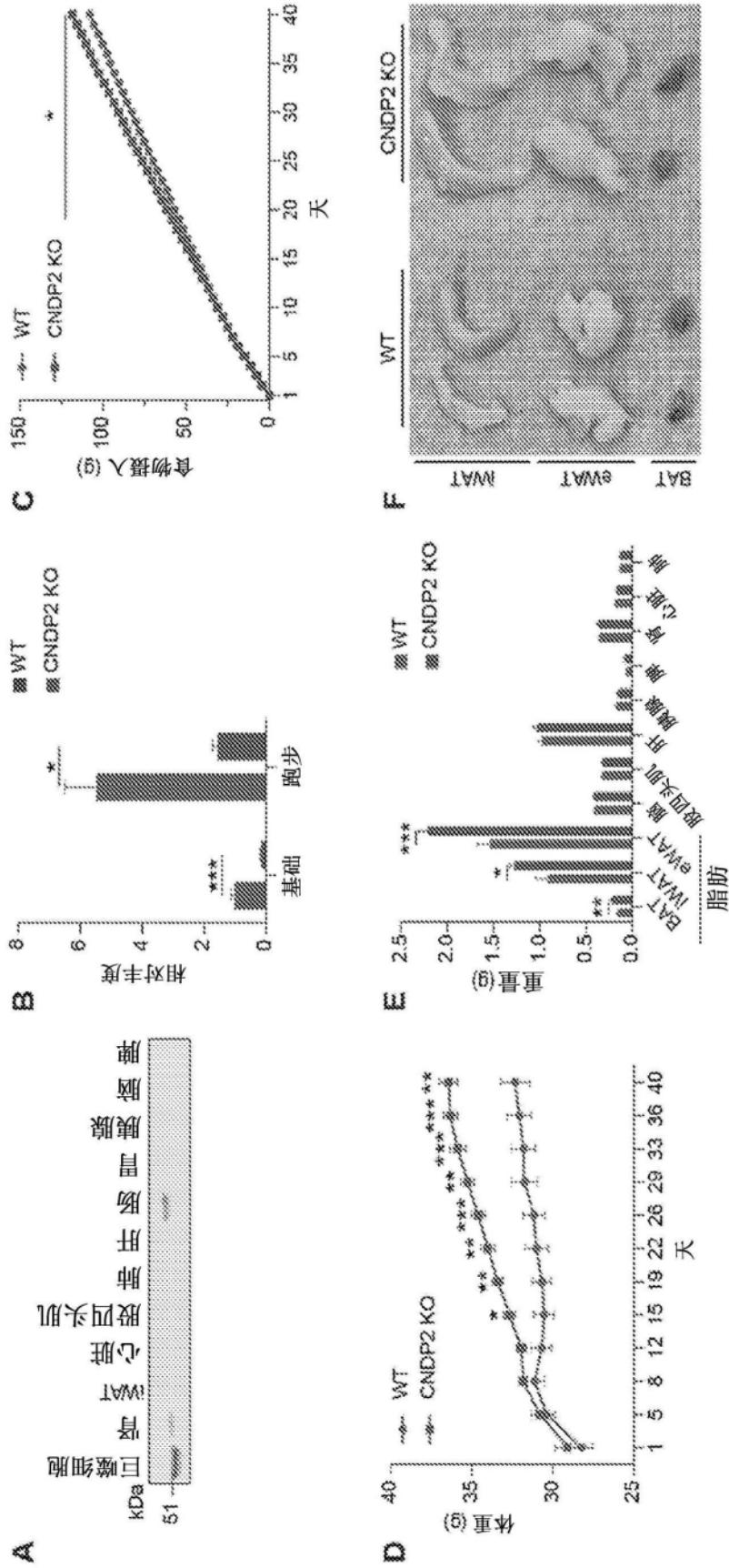


图4

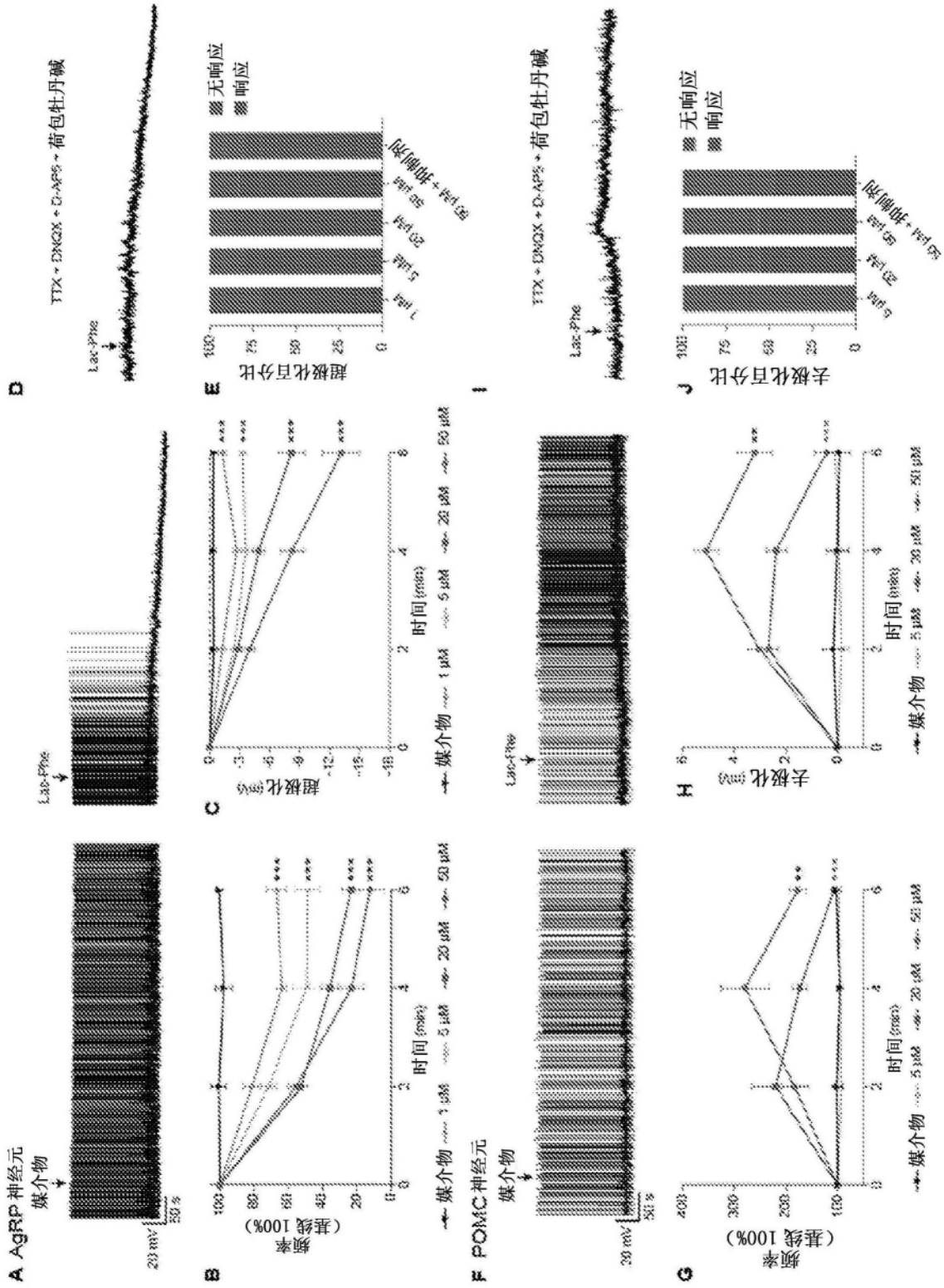


图5

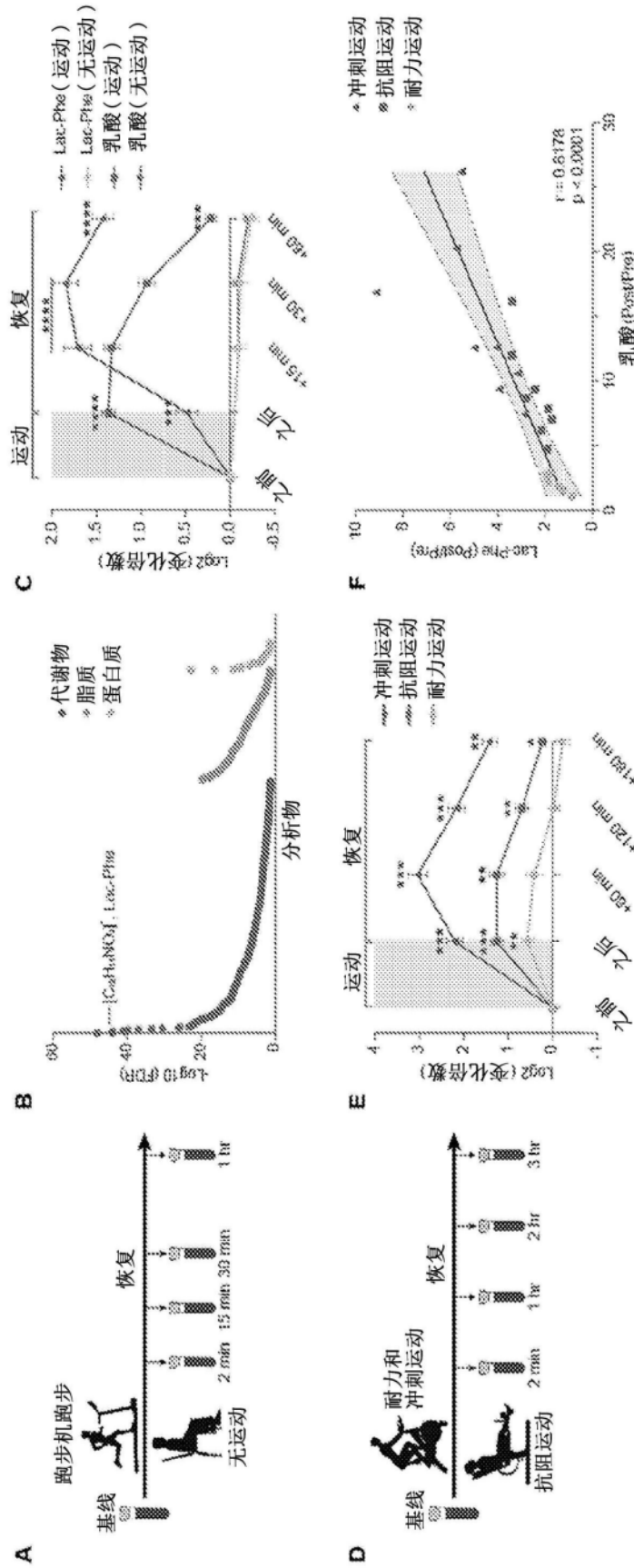


图6

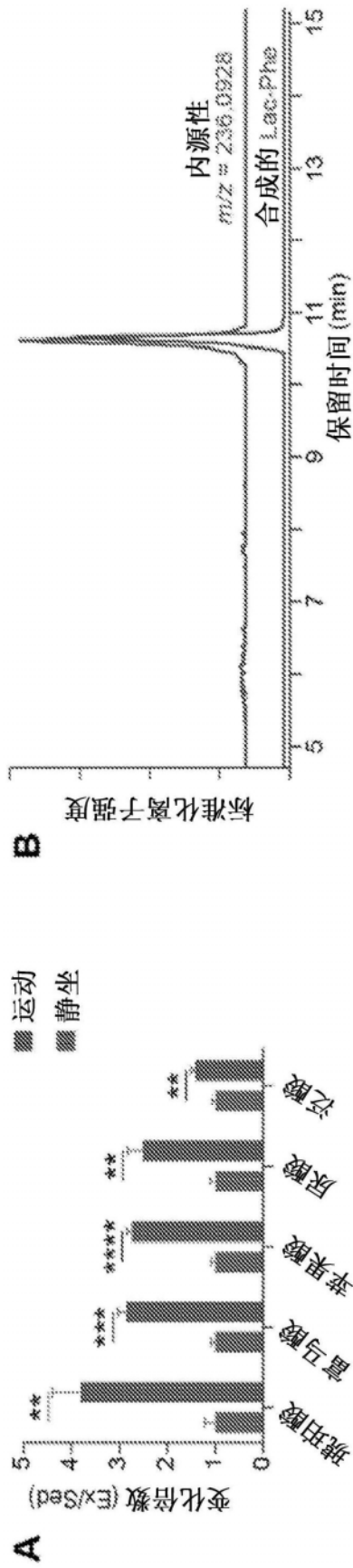


图7

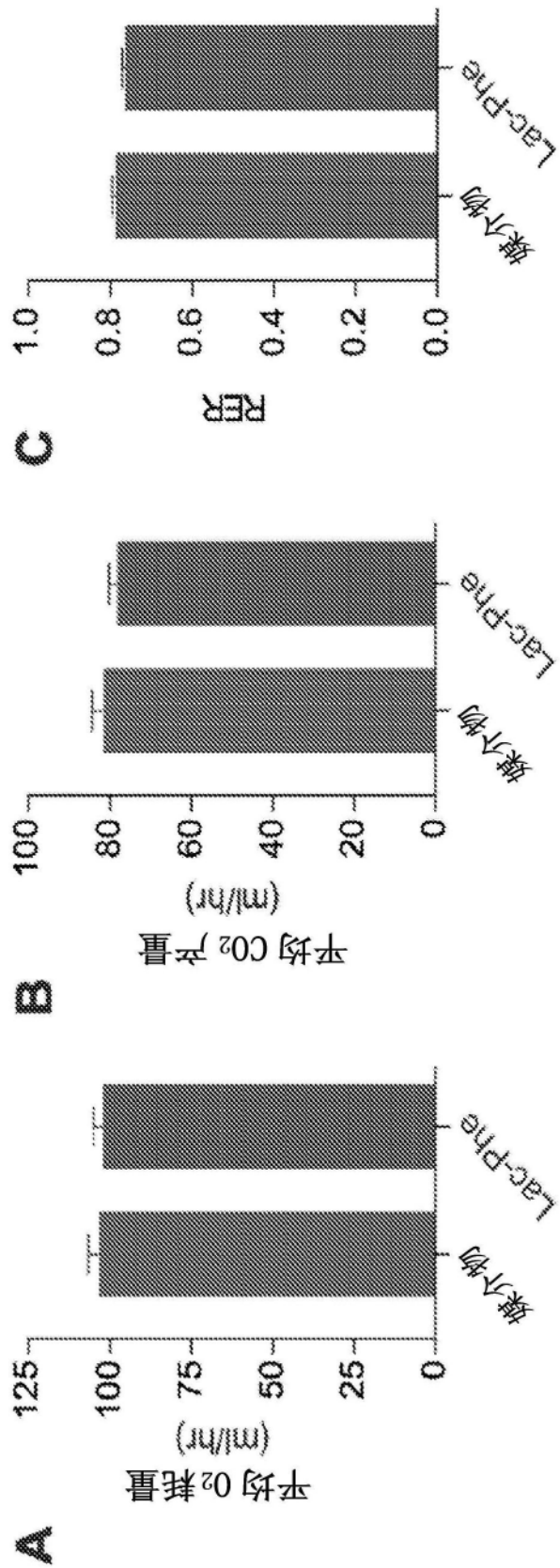


图8

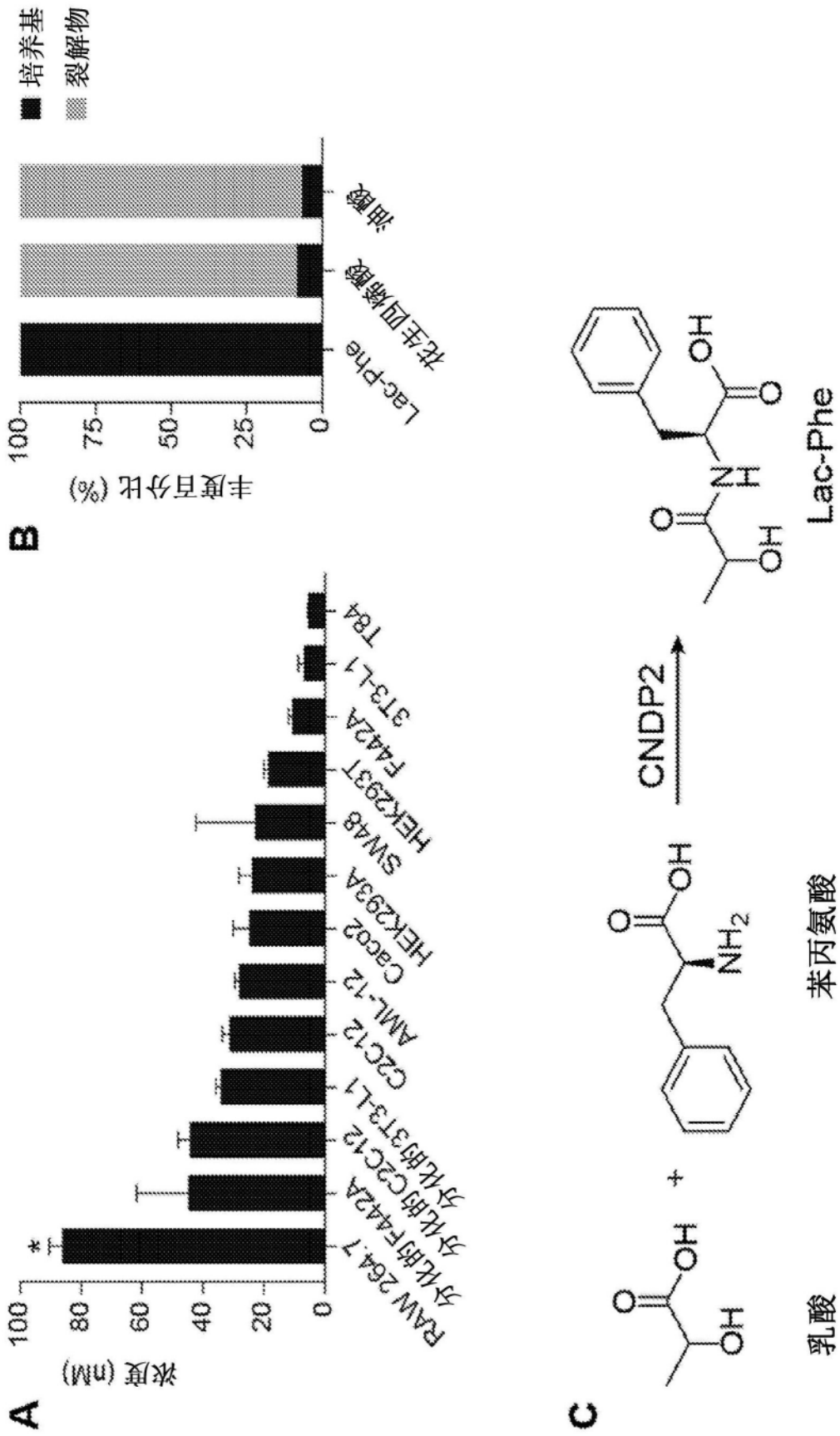


图9

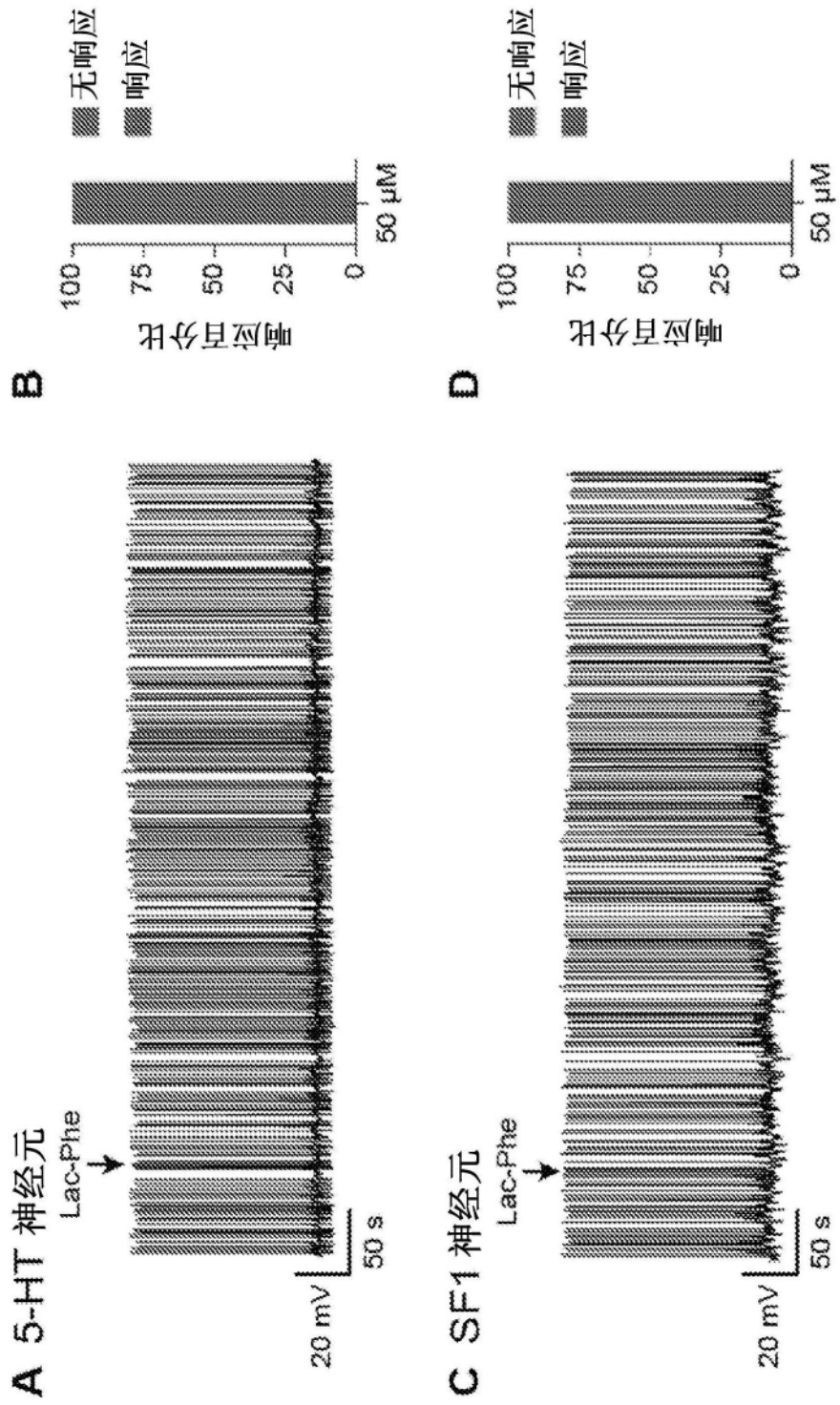


图10

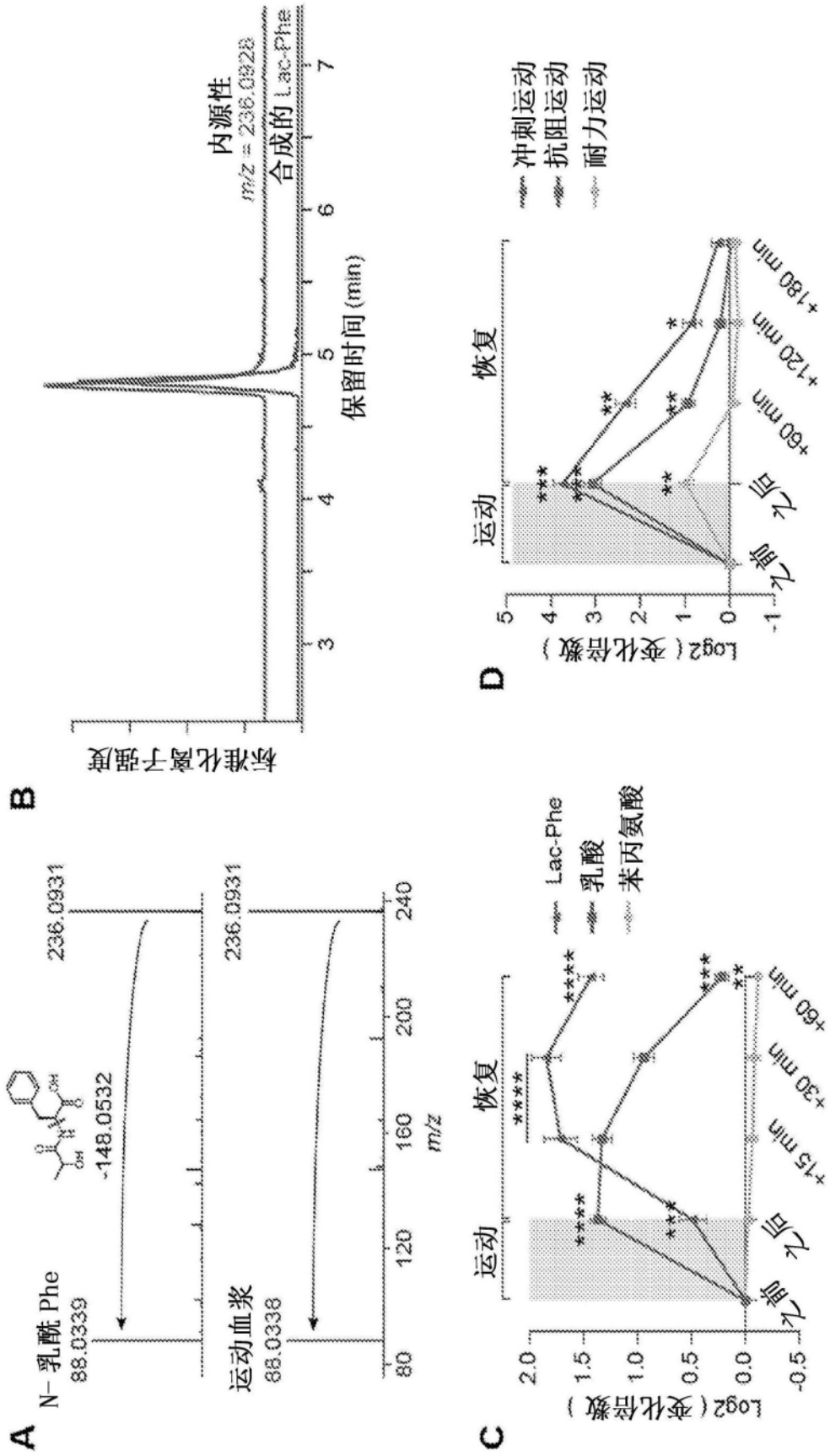


图11

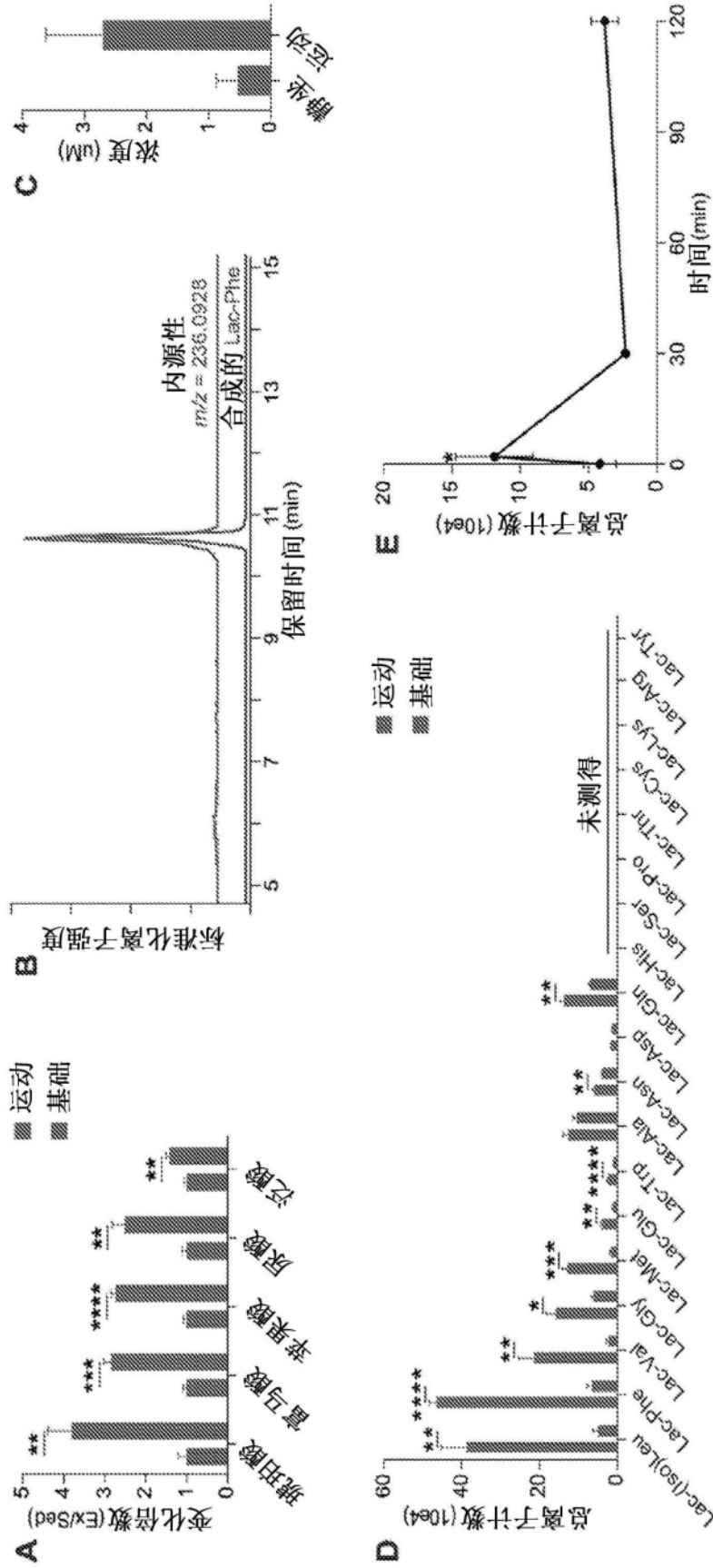


图12

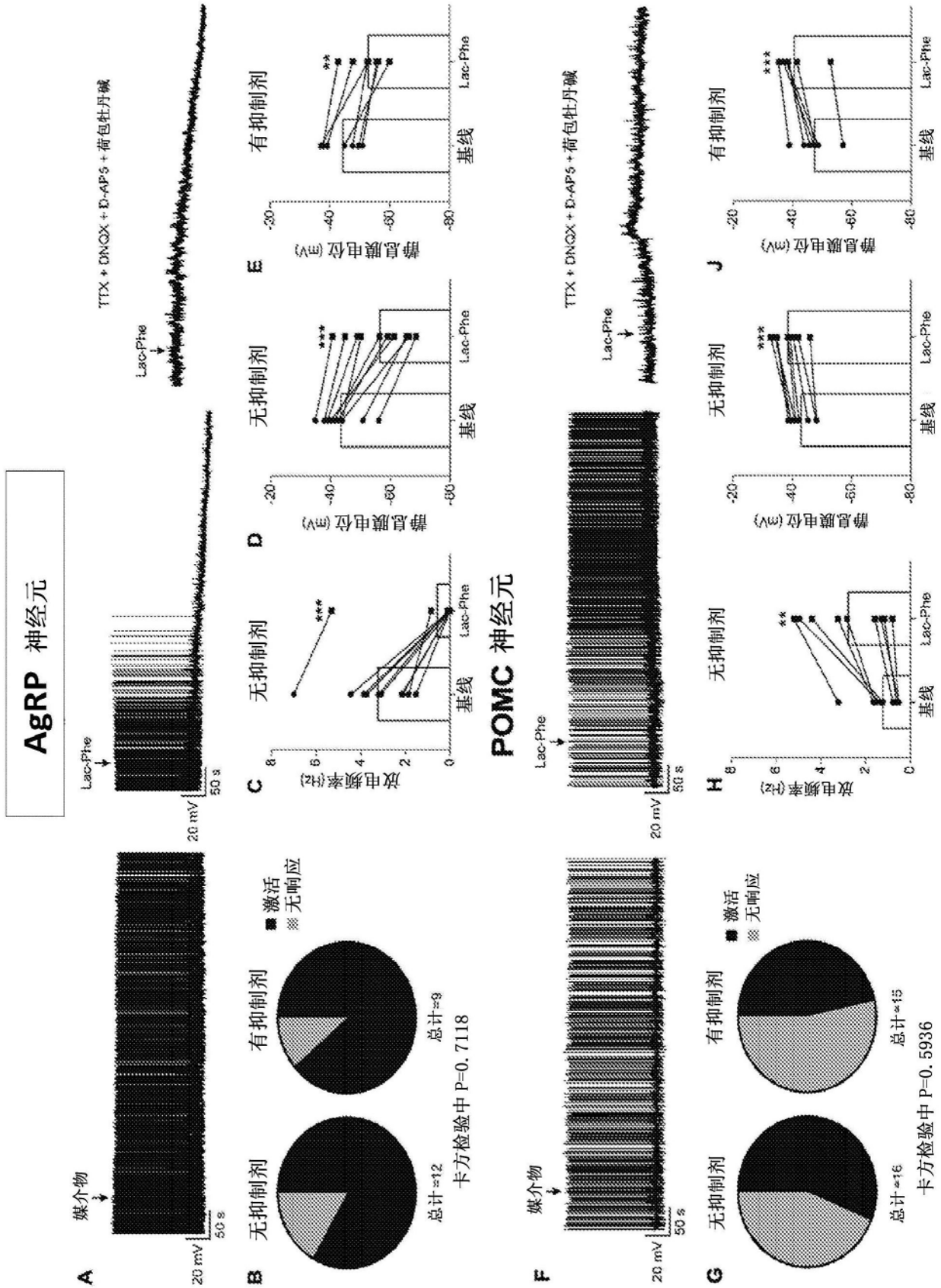


图13

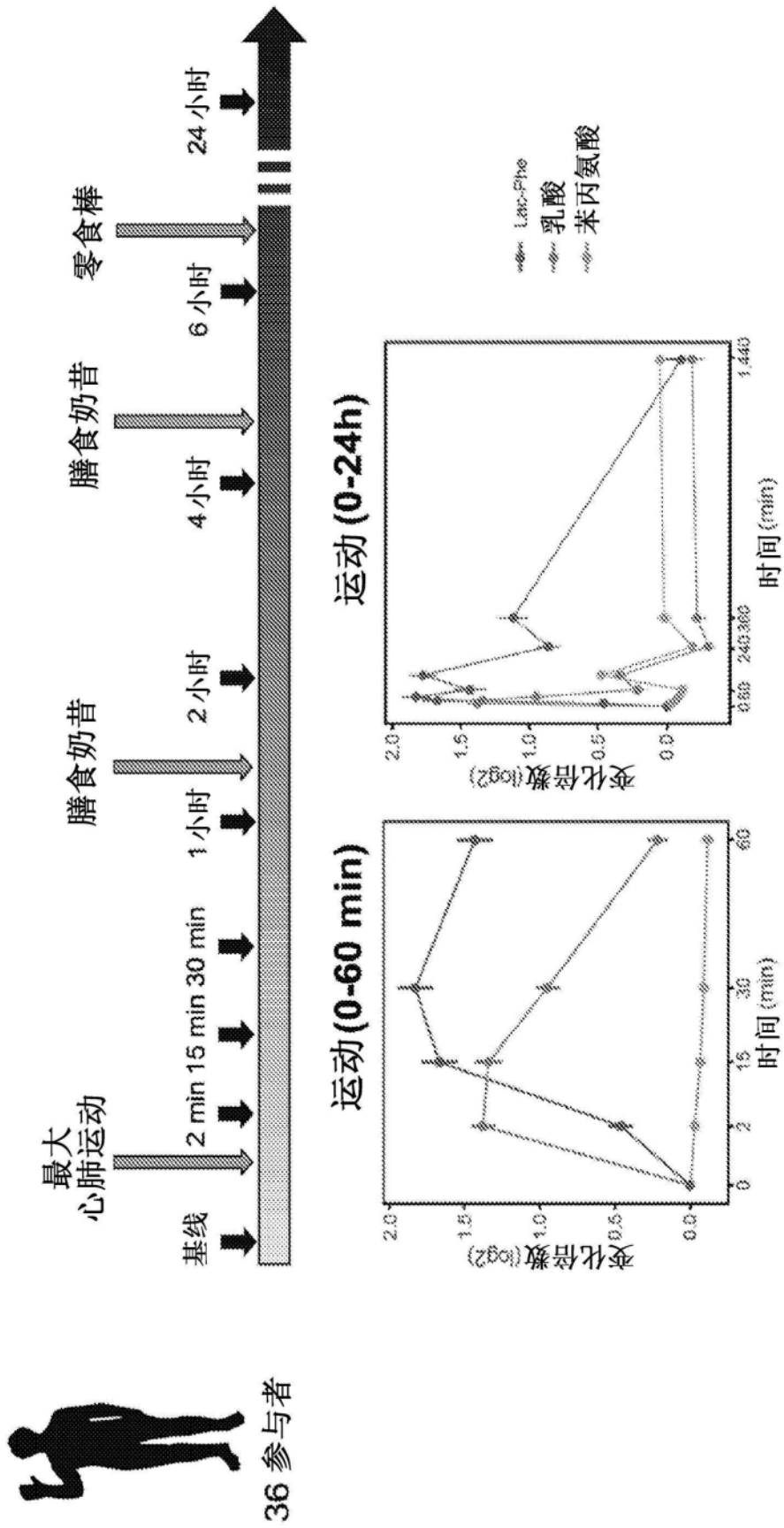


图15

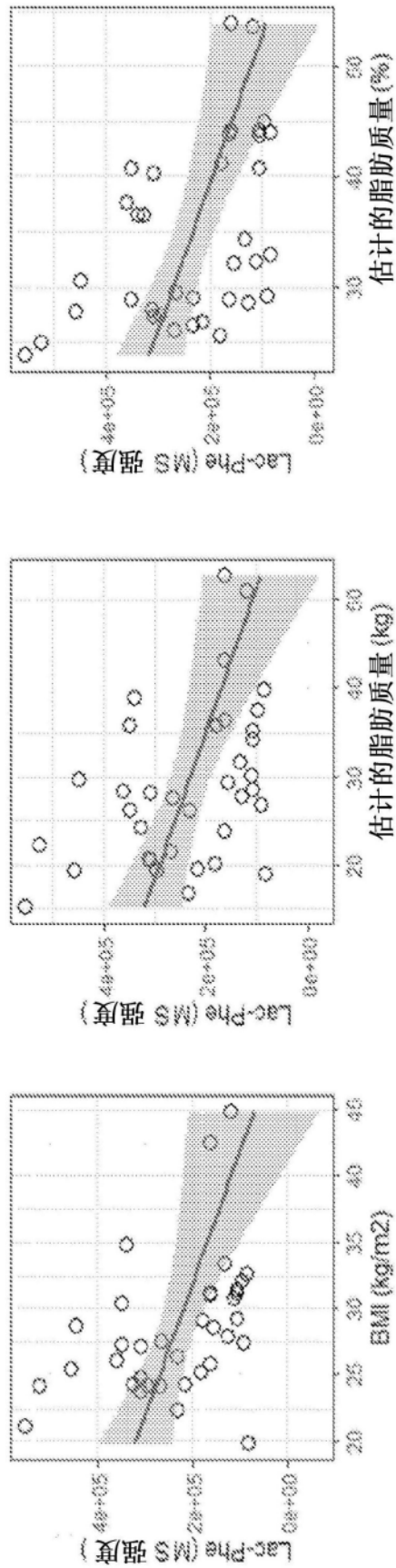


图16

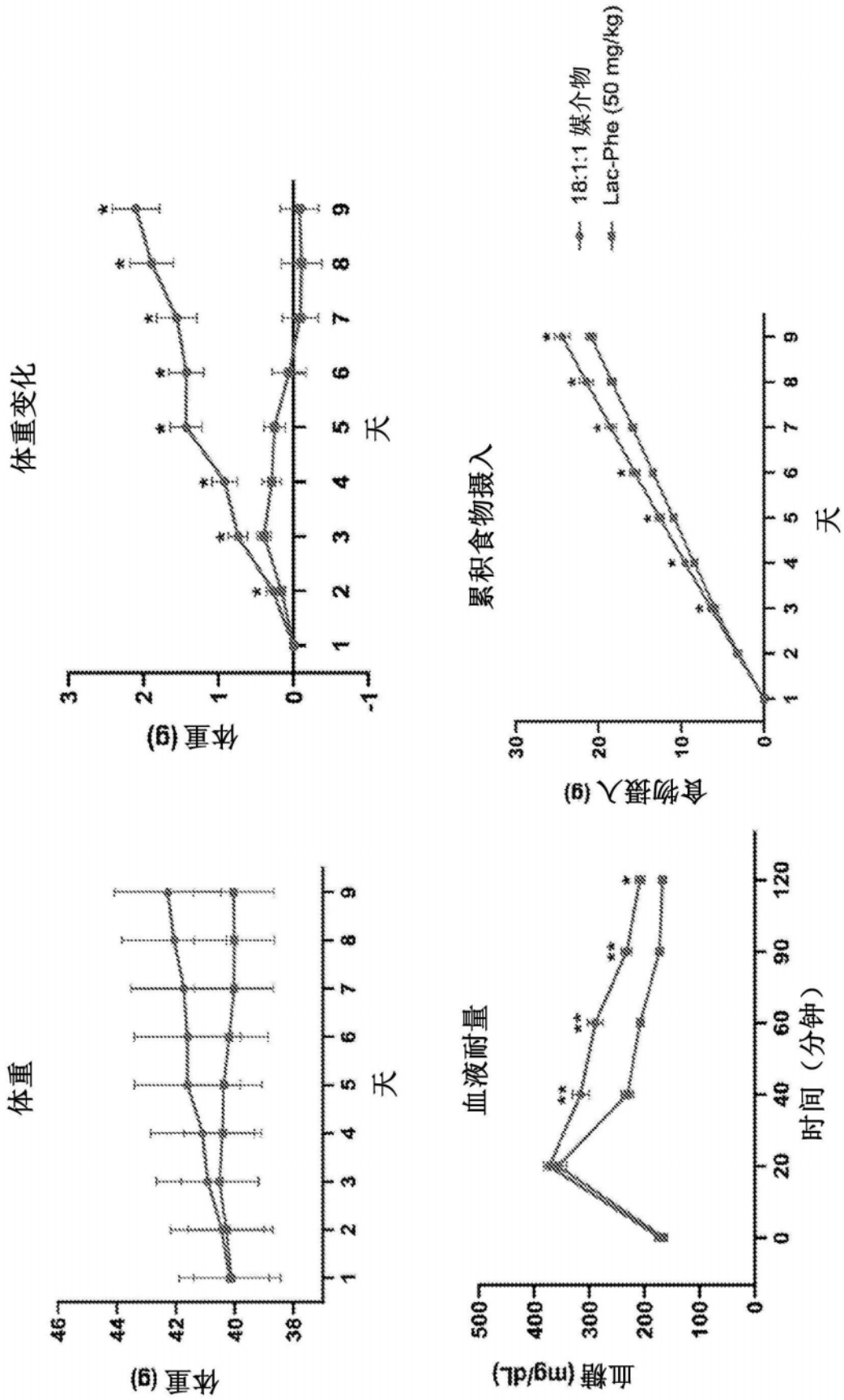


图17

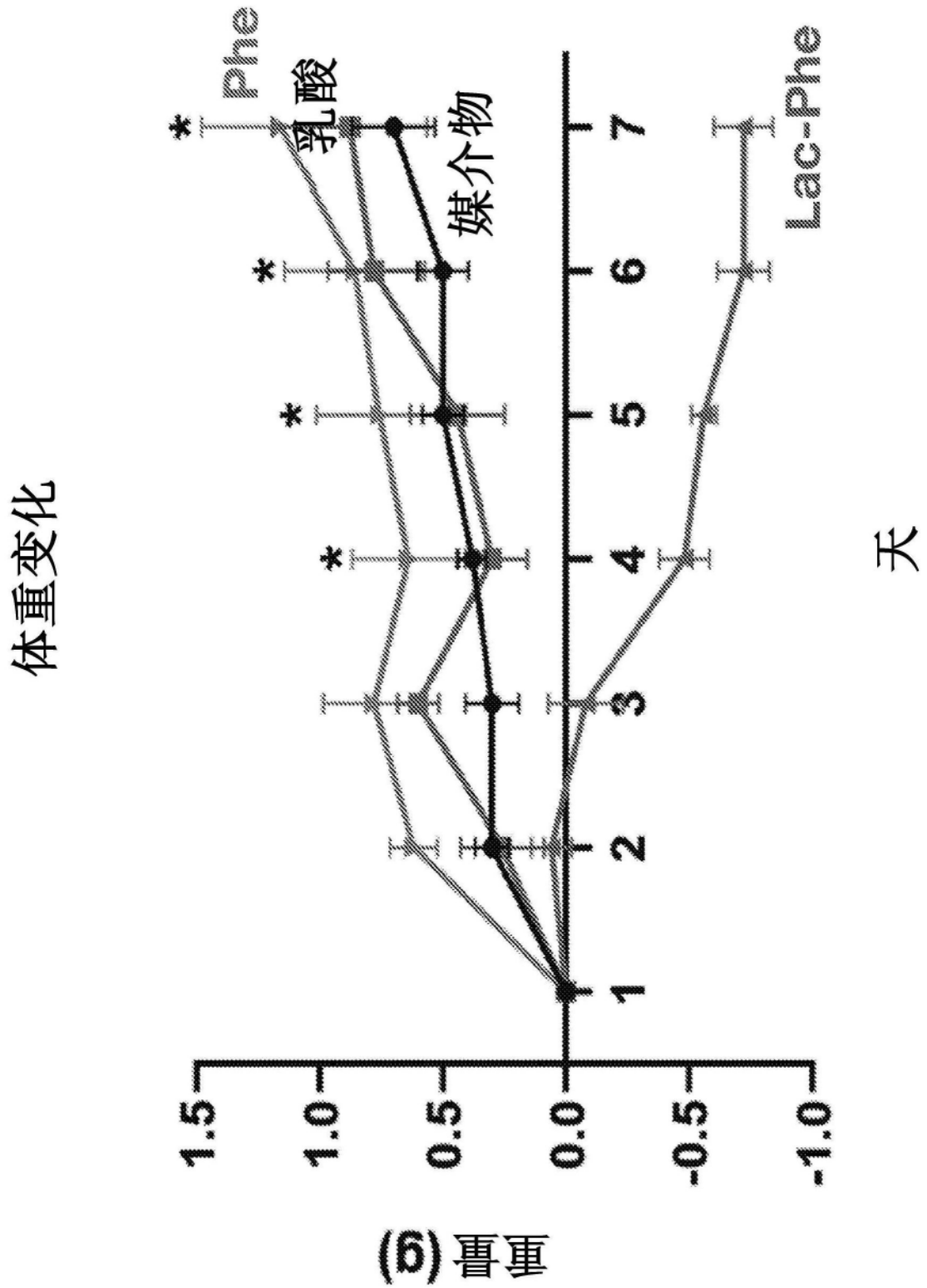


图18

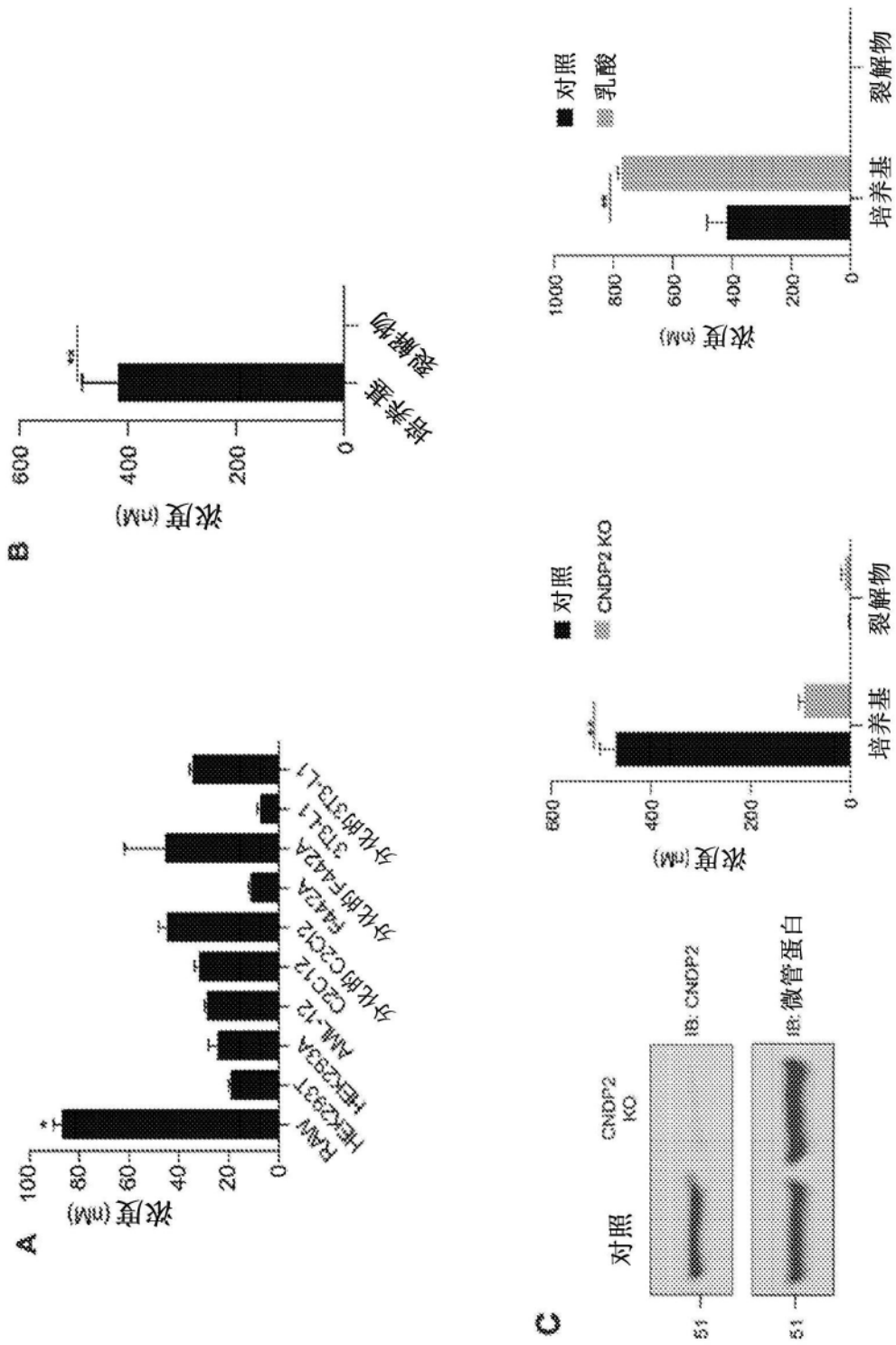


图19

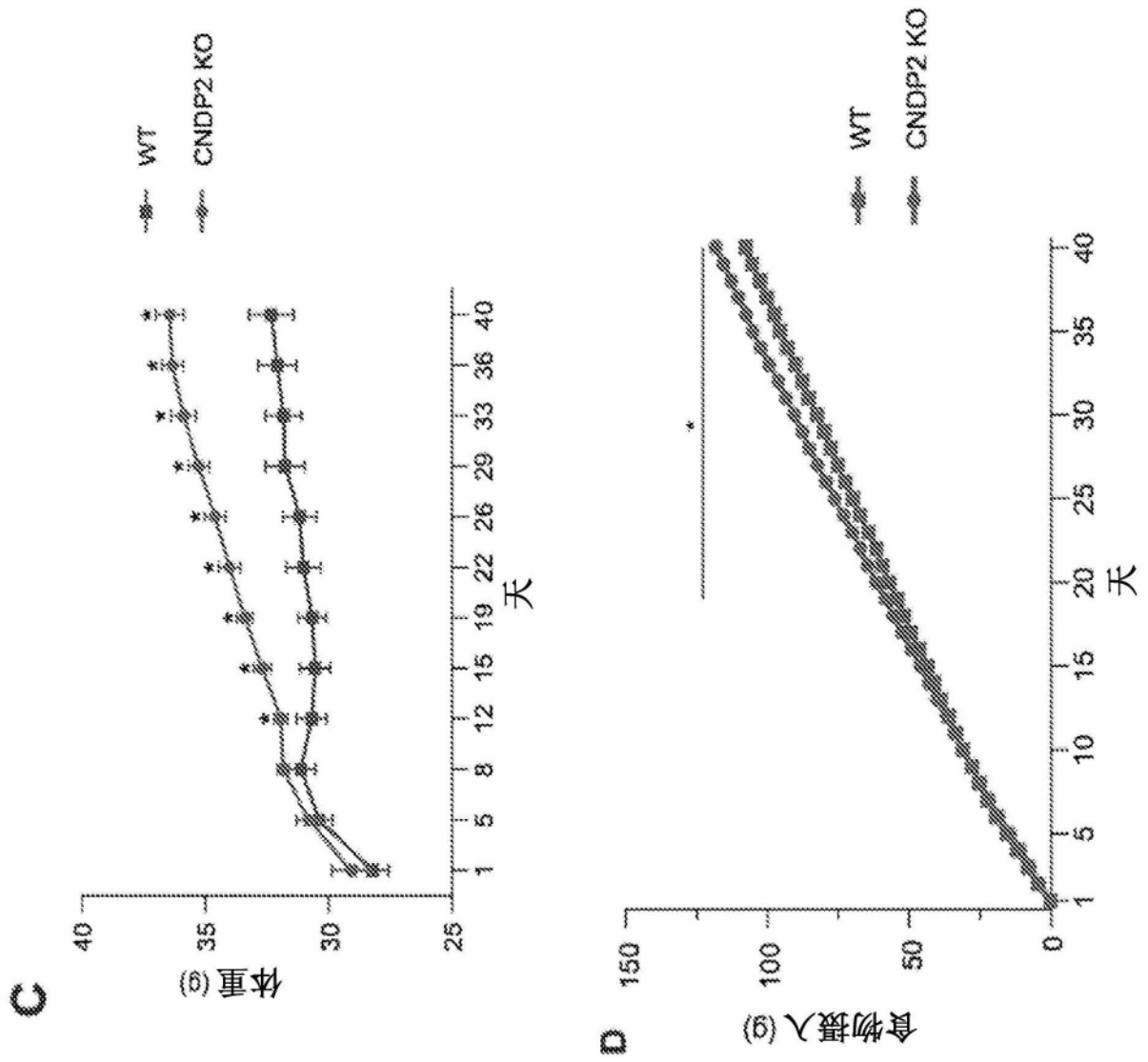


图20

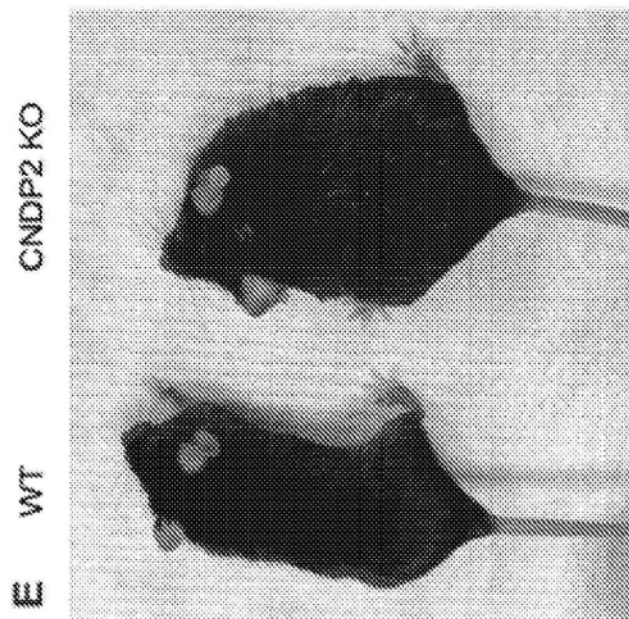
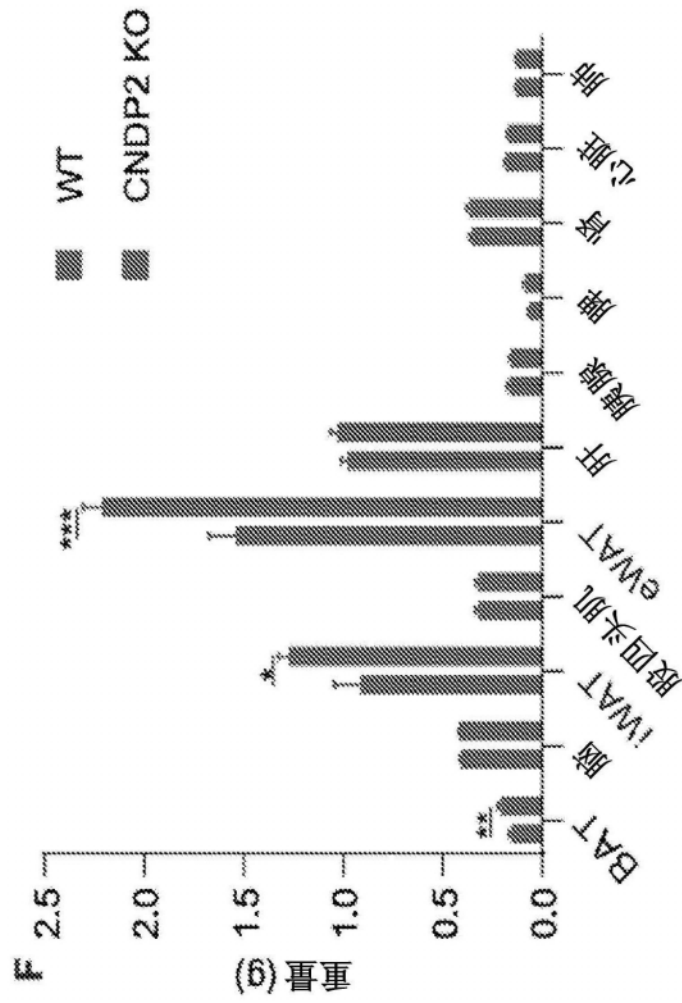


图20续

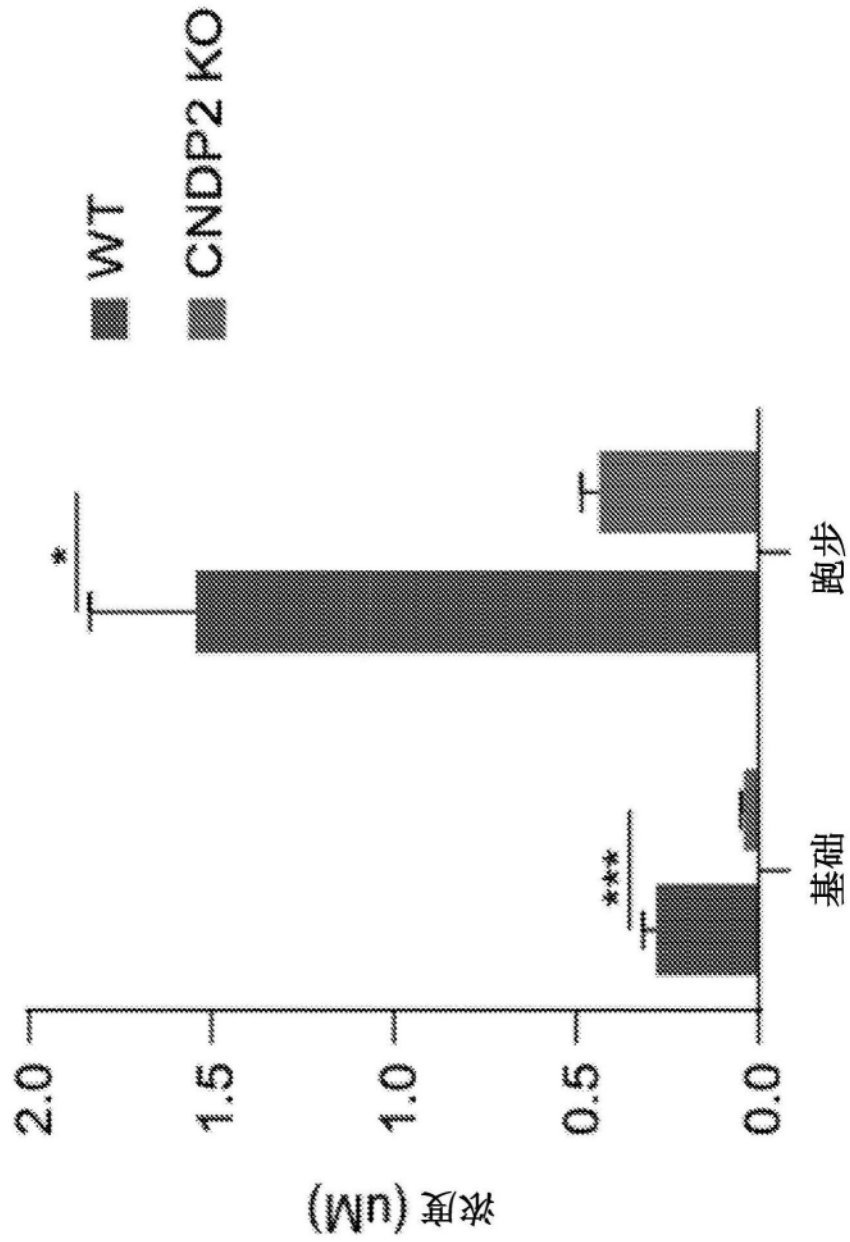


图21

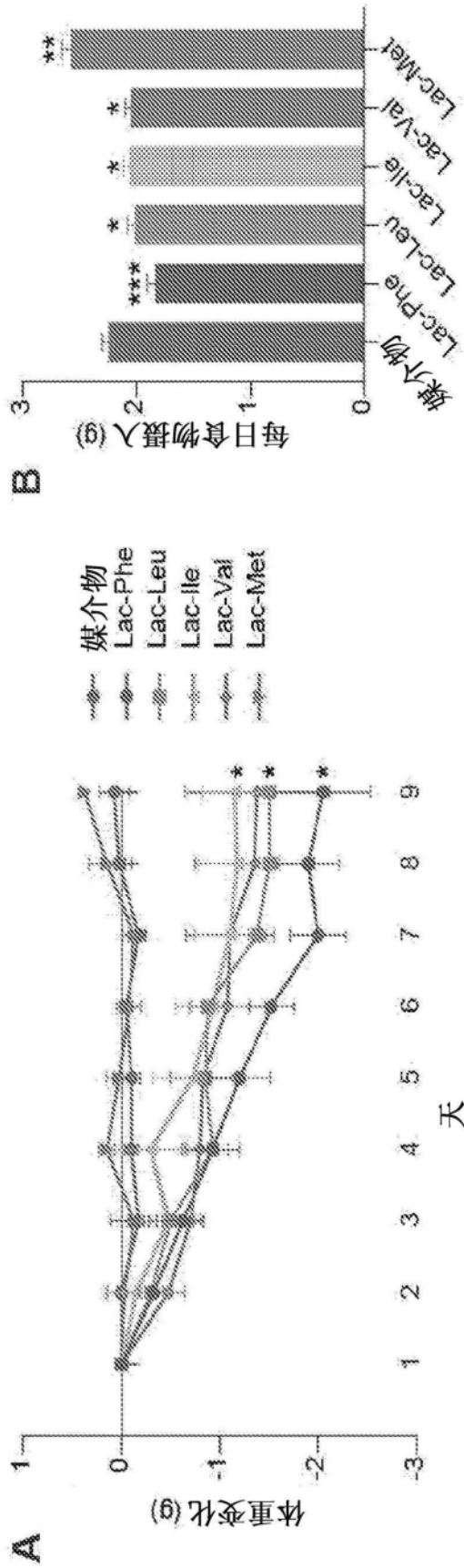


图22