



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103648531 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201180036214. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 05. 20

A61K 45/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7088 (2006. 01)

61/346, 843 2010. 05. 20 US

A61K 31/713 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/00 (2006. 01)

2013. 01. 21

A61K 39/395 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 3/04 (2006. 01)

PCT/JP2011/061653 2011. 05. 20

A61P 3/06 (2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/145723 JA 2011. 11. 24

(83) 生物保藏信息

NITE BP-1092 2011. 05. 02

NITE BP-1093 2011. 05. 02

(71) 申请人 宫崎彻

地址 日本东京

申请人 大日本住友制药株式会社

(72) 发明人 宫崎彻

(74) 专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限

公司 11286

代理人 韩明星 鲁恭诚

权利要求书2页 说明书29页

序列表10页 附图22页

(54) 发明名称

用于预防或治疗代谢综合症的方法

(57) 摘要

本发明旨在提供一种用于预防或治疗代谢综合症的方法，其可以通过抑制巨噬细胞浸润进入脂肪组织中在上游停止代谢综合症中类似多米诺效应的疾病链。本发明提供了一种用于预防或治疗代谢综合症的方法，该方法包括将 AIM 抑制剂施用到对象的步骤。

1. 一种用于预防或治疗代谢综合症或其相关疾病的方法,所述方法包括将 AIM 抑制剂施用到对象的步骤。
 2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述 AIM 抑制剂降低血液中 AIM 的稳定性。
 3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述 AIM 抑制剂抑制 AIM 与 CD36 之间的结合。
 4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述 AIM 抑制剂抑制 AIM 进入靶细胞中。
 5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述 AIM 抑制剂抑制 AIM 从内含体转移到细胞质。
 6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述 AIM 抑制剂抑制 AIM 结合到脂肪酸合酶。
 7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述 AIM 抑制剂抑制 AIM 的表达。
 8. 根据权利要求 1-7 中任意一项所述的方法,其中,所述代谢综合症或其相关疾病是从由代谢综合症、肥胖症、胰岛素抗性、糖尿病、高血脂症、高血压、动脉硬化疾病、肝脏疾病、肝失疏泄、脑血管疾病、局部缺血性心脏病、心力衰竭、痴呆症、脑溢血、神经症、肾脏疾病、脂肪细胞因子分泌异常以及血液游离脂肪酸量异常组成的组中选择的至少一种。
 9. 根据权利要求 1-8 中任意一项所述的方法,其中,所述对象是人。
10. 根据权利要求 1-8 中任意一项所述的方法,其中,所述对象是非人类的哺乳动物或鸟类。
 11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述对象是狗或猫。
12. 一种用于预防或治疗代谢综合症或其相关疾病的药剂,所述药剂包括从以下组中选择的至少一种：
抗 AIM 抗体；
抗 CD36 抗体；
对 AIM 基因具有 RNAi 效应的双链核酸；
AIM 基因的反义核酸；
AIM 基因的核酶；
结合到抗 AIM 抗体而不抑制脂肪酸合酶活性的蛋白质；
结合到 CD36 而不抑制脂肪酸合酶活性的蛋白质；
结合到脂肪酸合酶而不抑制脂肪酸合酶活性的蛋白质；以及
可溶 CD36。
13. 根据权利要求 12 所述的治疗药剂,其中,所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源抗体、人源化抗体、嵌合抗体或抗体片段。
14. 根据权利要求 12 或 13 所述的治疗药剂,其中,所述结合到脂肪酸合酶而不抑制脂肪酸合酶活性的蛋白质结合到从由 DH、ER、TE 和 CC 组成的组中选择的至少一种结构域。
15. 根据权利要求 12 或 13 所述的治疗药剂,其中,所述结合到抗 AIM 抗体而不抑制脂肪酸合酶活性的蛋白质选自于由 AIM 片段、AIM 变异体或其片段以及 AIM 嵌合蛋白质或其片段组成的组。
16. 根据权利要求 12 或 13 所述的治疗药剂,其中,所述结合到 CD36 而不抑制脂肪酸合酶活性的蛋白质选自于由 AIM 片段、AIM 变异体以及 AIM 嵌合蛋白质组成的组。
17. 根据权利要求 12 或 13 所述的治疗药剂,其中,所述结合到脂肪酸合酶而不抑制脂肪酸合酶活性的蛋白质选自于由 AIM 片段、AIM 类似物、AIM 变异体以及 AIM 嵌合蛋白质组

成的组。

18. 根据权利要求 15-17 中任意一项所述的治疗药剂, 其中, 所述 AIM 片段选自于包含 AIM 蛋白质的功能域及其保守区域的片段。

19. 根据权利要求 12-18 中任意一项所述的治疗药剂, 其中, 所述代谢综合症或其相关疾病是从由代谢综合症、肥胖症、胰岛素抗性、糖尿病、高血脂症、高血压、动脉硬化疾病、肝脏疾病、肝失疏泄、脑血管疾病、局部缺血性心脏病、心力衰竭、痴呆症、脑溢血、神经症、肾脏疾病、脂肪细胞因子分泌异常以及血液游离脂肪酸量异常组成的组中选择的至少一种。

20. 根据权利要求 12-19 中任意一项所述的治疗药剂, 其中, 所述对象是人。

21. 根据权利要求 12-19 中任意一项所述的治疗药剂, 其中, 所述对象是非人类的哺乳动物或鸟类。

22. 根据权利要求 21 所述的治疗药剂, 其中, 所述对象是狗或猫。

23. 一种用于预防或治疗代谢综合症或其相关疾病的方法, 所述方法包括施用根据权利要求 12-22 中任意一项所述的治疗药剂的步骤。

24. 一种生产 AIM 抑制剂的方法, 所述方法包括:

用蛋白酶处理 AIM 以获得 AIM 片段的步骤, 以及

通过其中固定有结合到 AIM 的功能域或保守区域的抗 AIM 抗体的亲和柱纯化所述 AIM 片段的步骤。

用于预防或治疗代谢综合症的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种预防或治疗代谢综合症的方法,该方法包括将 AIM 抑制剂施用到对象。

背景技术

[0002] 通常,已知诸如糖尿病、高血脂症、高血压和肥胖症的与生活方式相关的疾病经常聚集于一个人。尽管这些疾病有分别成为动脉硬化症的风险,但是当聚集时,风险变得非常高。因此,已经提出了多个名称以表示这些疾病聚集的病理。

[0003] 目前,用标准名称 - 代谢综合症来表示包括糖尿病、高血脂症、高血压、肥胖症和胰岛素抗性作为基本构成要素的疾病概念,其中,这些疾病经常聚集于一个人并使导致动脉硬化疾病的风险变高。

[0004] 通常,在代谢综合症中,内脏脂肪型肥胖症,即腹腔内过量聚集中性脂肪的肥胖症,是核心病理。由肥胖症引起的胰岛素抗性相继引发高血压、糖尿病、高血脂症等,它们的聚集和联系引发动脉硬化疾病。这种现象被比作多米诺效应,近些年提出了“代谢多米诺”的概念。

[0005] 也就是说,就像一旦开始倾倒就难以恢复的多米诺效应一样,一系列病理朝一个方向行进,并且长期地以持续的方式慢性地引发各种疾病。

[0006] 代谢综合症的治疗不以症状的减缓为目的,而是以预防各种疾病尤其是后来可能引发的动脉硬化疾病的起始为目的。

[0007] 如上所述,在代谢多米诺的概念下,由于一旦开始,行进就难以恢复到原来的状态,所以期望在上游抑制行进。

[0008] 迄今进行的研究已经阐明,在代谢综合症中,当过量的中性脂肪聚集在腹腔内的脂肪细胞中时,由于发生来自脂肪细胞的脂肪细胞因子的分泌量异常、血液游离脂肪酸的增加以及脂肪组织的慢性炎症,所以诸如胰岛素抗性、糖尿病、高血脂症、高血压等与生活方式相关的疾病以及继发的疾病像链式反应一样被引发。

[0009] 因此,在代谢综合症的预防或治疗中,优选考虑以诸如脂肪细胞因子的分泌、血液游离脂肪酸和脂肪组织的慢性炎症的上游事件为目标。

[0010] 在它们之中,已经阐明脂肪组织的慢性炎症的发生是由于伴随肥胖症浸润进入脂肪组织的巨噬细胞增加(参见,例如,非专利文献 1 和 2)。

[0011] 巨噬细胞的活化状态包括两种 :M1 和 M2。M1 也被称作经典活化巨噬细胞,并表现出使诸如 TNF- α 、IL-6 和 IL-12 等的炎性细胞因子和诱导性一氧化氮合成酶(iNOS)的产生增加。M2 也被称作替代活化巨噬细胞,并表现出使炎性细胞因子的产生下降并使诸如 IL-10 等的抗炎性细胞因子和抑制 iNOS 活性的精氨酸酶的产生增加。

[0012] 已知在非肥胖症的情况下,浸润进入脂肪组织的巨噬细胞主要是 M2,而随着肥胖症的行进主要是 M1(参见,例如,非专利文献 3)。

[0013] 也已经报道,在巨噬细胞特异性 PPAR γ - 缺陷小鼠中,不存在 M2 并且高脂肪饮食

诱发的肥胖症和胰岛素抗性增强(非专利文献 4);巨噬细胞 PPAR γ 的失活导致在正常饮食的不肥胖小鼠的骨骼肌和肝脏中葡萄糖耐受性和胰岛素抗性的下降(非专利文献 5);巨噬细胞特异性 Cap (Cbl 相关蛋白质)缺陷小鼠表现出脂肪组织中巨噬细胞浸润的下降以及由高脂肪饮食负荷(high-fat diet loading)导致的胰岛素抗性的表达减弱(非专利文献 6);等等。因此,暗示了浸润进入脂肪组织的巨噬细胞 M1 在胰岛素抗性的表达中发挥着重要的作用。

[0014] 脂肪组织的慢性炎症在代谢综合症的发生中的深度参与与许多代谢综合症患者是高敏 CRP 阳性的报道一致,这表明轻度炎症的存在以及具有抗炎作用的水杨酸和噻唑烷药剂的施用改善了胰岛素抗性。

[0015] 此外,同野生型小鼠相比,在 CCR2 (C-C 趋化因子受体 2)敲除小鼠中,对与肥胖症相关的脂肪细胞因子的产生的异常控制(abnormal control)得到改善,其中,CCR2 敲除小鼠表现出巨噬细胞进入脂肪组织的浸润的下降(非专利文献 7)。因此,认为浸润进入脂肪组织的巨噬细胞也参与脂肪细胞因子的产生的瓦解控制(collapsed control)。

[0016] 综上所述,认为在代谢综合症的预防或治疗中,通过以浸润进入脂肪组织的炎性巨噬细胞为目标,能够在诸如脂肪组织中的慢性炎症和脂肪细胞因子产生的瓦解控制的代谢多米诺的最上游的位点停止代谢多米诺的行进。

[0017] 然而,还未阐明伴随肥胖症的巨噬细胞诱导进入脂肪组织的机制。

[0018] 例如,报道已经证明了巨噬细胞诱导效率在单核细胞趋化因子 MCP-1 敲除小鼠和 CCR2 敲除小鼠中降低,但是该效率依据报道而变化。另外,也有报道表明巨噬细胞的浸润在 MCP-1 敲除小鼠中得到促进。

[0019] 因此,存在讨论 MCP-1 和 CCR2 与巨噬细胞的诱导之间的因果关系的空间,至少它们不被认为是明确的(必要的)和基本的因素。

[0020] 自然,还没有发现通过抑制巨噬细胞浸润进入脂肪组织的基本原因来在代谢多米诺的最上游中止代谢多米诺行进的方法。

[0021] 同时,本发明人已经发现来自组织巨噬细胞的巨噬细胞凋亡抑制因子(AIM)(参见非专利文献 9)。AIM 是可溶性蛋白质,是清道夫受体富含半胱氨酸(SRCR)超家族的成员。AIM 首先作为保护巨噬细胞免受各种凋亡诱导剂影响的凋亡抑制因子被发现(参见非专利文献 9)。

[0022] 因为 AIM 的结构具有 3 个 SRCR 结构域,与 CD5 的细胞外结构域相似,所以 AIM 也称作 CD5L (CD5- 相似)。

[0023] [文献列表]

[0024] 非专利文献

[0025] 非专利文献 1 :Weisberg, S. P. 等人, J. Clin. Invest., 2003, 112:1796-1808

[0026] 非专利文献 2 :Xu, H. 等人, J. Clin. Invest., 2006, 116:115-124

[0027] 非专利文献 3 :Lumeng, C. N. 等人, J. Clin. Invest., 2007, 117:175-184

[0028] 非专利文献 4 :Odegaard, J. L. 等人, Nature, 2007, 447:1116-1121

[0029] 非专利文献 5 :Hevener, A. L. 等人, J. Clin. Invest., 2007, 117:1658-1669

[0030] 非专利文献 6 :Lesniewski, L. A. 等人, Nature Med., 2007, 13:455-462

[0031] 非专利文献 7 :Weisberg, S. P. 等人, J. Clin. Invest., 2006, 116:115-124

- [0032] 非专利文献 8 :Kanda, H. 等人 , J. Clin. Invest. , 2006, 116:1494–1505
- [0033] 非专利文献 9 :Miyazaki, T. 等人 , J. Exp. Med. 189, 413–422 (1999)
- [0034] 非专利文献 10 :Arai, S. 等人 , Cell Metab. 1, 201–213 (2005)

发明内容

[0035] 技术问题

[0036] 本发明旨在提供一种用于预防或治疗代谢综合症的方法,其可以通过抑制巨噬细胞浸润进入脂肪组织中在上游停止代谢综合症中类似多米诺效应的疾病链。

[0037] 技术方案

[0038] 在本发明者对 AIM 进一步研究过程中,我们发现在动脉粥样硬化病变中,巨噬细胞内吞脂质并产生 AIM,由于产生的 AIM 支持病变部位巨噬细胞的凋亡抑制,所以产生的 AIM 也参与动脉硬化症的发展。另外,我们已经制备了 AIM 缺陷小鼠,并证实了 AIM 缺陷显著地减轻了动脉硬化症(Arai, S. 等人 , Cell Metab. 1, 201–213 (2005))。

[0039] 同时,本发明者已经发现,如在下述参考示例中所示, AIM 也在浸润进入肥胖脂肪组织的巨噬细胞中表达。另外,我们发现:在存在 AIM 的情况下,前脂肪细胞分化成为成熟脂肪细胞受到抑制;在存在 AIM 的情况下,在成熟脂肪细胞中引起脂滴的分解(脂解作用);在存在 AIM 的情况下,脂肪细胞的尺寸趋于变小;因此, AIM 本身作为抗肥胖症药物是有用的。

[0040] 另外,我们还发现:脂肪组织中产生的 AIM 结合到细胞表面上的 CD36 并通过内吞作用进入到脂肪细胞中;产生的 AIM 结合到细胞中的脂肪酸合酶(FAS)并抑制其活性,即, AIM 的直接目标分子是 FAS,并且 AIM 通过抑制 FAS 活性抑制前脂肪细胞分化成为成熟脂肪细胞并抑制脂滴的分解。

[0041] 然而,本发明者现在已经发现看起来与上述发现明显相反的现象;即, AIM 直接参与代谢综合症的发生。

[0042] 具体地讲,我们已经通过体内研究证实:伴随肥胖症, AIM 的血液浓度增加;即使在 AIM 敲除小鼠已经变肥胖之后,它们的脂肪组织中也几乎看不到巨噬细胞的浸润;并且通过对 AIM 敲除小鼠全身施用重组 AIM,炎性巨噬细胞浸润进入脂肪组织中。

[0043] 另外,我们已经通过体内研究证实,炎性巨噬细胞浸润进入脂肪组织中是由脂滴融解的诱导所导致的巨噬细胞的迁移引起的,脂滴融解是通过因肥胖症使 AIM 血液浓度增加而抑制 FAS 活性引起的。

[0044] 另外,我们已经发现,即使在通过采取高脂肪饮食使 AIM 敲除小鼠变肥胖时,小鼠的葡萄糖代谢也不会下降,因此,即使小鼠变得肥胖,对 AIM 抑制也可以防止类似多米诺效应的代谢综合症的一系列疾病的后续链式起始和行进,这导致了本发明的完成。

[0045] 因此,本发明涉及:

[0046] [1] 一种用于预防或治疗代谢综合症或其相关疾病的方法,该方法包括将 AIM 抑制剂施用到对象的步骤;

[0047] [2] 根据上述 [1] 所述的方法,其中,上述 AIM 抑制剂降低血液中 AIM 的稳定性;

[0048] [3] 根据上述 [1] 所述的方法,其中,上述 AIM 抑制剂抑制 AIM 与 CD36 之间的结合;

- [0049] [4] 根据上述 [1] 所述的方法, 其中, 上述 AIM 抑制剂抑制 AIM 进入靶细胞中 ;
- [0050] [5] 根据上述 [1] 所述的方法, 其中, 上述 AIM 抑制剂抑制 AIM 从内含体转移到细胞质 ;
- [0051] [6] 根据上述 [1] 所述的方法, 其中, 上述 AIM 抑制剂抑制 AIM 结合到脂肪酸合酶 (FAS) ;
- [0052] [7] 根据上述 [1] 所述的方法, 其中, 上述 AIM 抑制剂抑制 AIM 的表达 ;
- [0053] [8] 根据上述 [1]–[7] 中任意一项所述的方法, 其中, 上述代谢综合症或其相关疾病是从由代谢综合症、肥胖症、胰岛素抗性、糖尿病、高血脂症、高血压、动脉硬化疾病、肝脏疾病、肝失疏泄、脑血管疾病、局部缺血性心脏病、心力衰竭、痴呆症、脑溢血、神经症、肾脏疾病、脂肪细胞因子分泌异常以及血液游离脂肪酸量异常组成的组中选择的至少一种 ;
- [0054] [9] 根据上述 [1]–[8] 中任意一项所述的方法, 其中, 上述对象是人 ;
- [0055] [10] 根据上述 [1]–[8] 中任意一项所述的方法, 其中, 上述对象是非人类的哺乳动物或鸟类 ;
- [0056] [11] 根据上述 [10] 所述的方法, 其中, 上述对象是狗或猫 ;
- [0057] [12] 一种用于预防或治疗代谢综合症或其相关疾病的药剂, 该药剂包括从以下组中选择的至少一种 :
- [0058] 抗 AIM 抗体 ;
- [0059] 抗 CD36 抗体 ;
- [0060] 对 AIM 基因具有 RNAi 效应的双链核酸 ;
- [0061] AIM 基因的反义核酸 ;
- [0062] AIM 基因的核酶 ;
- [0063] 结合到抗 AIM 抗体而不抑制 FAS 活性的蛋白质 ;
- [0064] 结合到 CD36 而不抑制 FAS 活性的蛋白质 ;
- [0065] 结合到 FAS 而不抑制 FAS 活性的蛋白质 ; 以及
- [0066] 可溶 CD36 ;
- [0067] [13] 根据上述 [12] 所述的治疗药剂, 其中, 上述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源抗体、人源化抗体、嵌合抗体或者抗体片段 ;
- [0068] [14] 根据上述 [12] 或 [13] 所述的治疗药剂, 其中, 上述结合到 FAS 而不抑制 FAS 活性的蛋白质结合到从由 DH、ER、TE 和 CC 组成的组中选择的至少一个结构域 ;
- [0069] [15] 根据上述 [12] 或 [13] 所述的治疗药剂, 其中, 上述结合到抗 AIM 抗体而不抑制 FAS 活性的蛋白质选自于由 AIM 片段、AIM 变异体或其片段以及 AIM 嵌合蛋白质或其片段组成的组 ;
- [0070] [16] 根据上述 [12] 或 [13] 所述的治疗药剂, 其中, 上述结合到 CD36 而不抑制 FAS 活性的蛋白质选自于由 AIM 片段、AIM 变异体以及 AIM 嵌合蛋白质组成的组 ;
- [0071] [17] 根据上述 [12] 或 [13] 所述的治疗药剂, 其中, 上述结合到 FAS 而不抑制 FAS 活性的蛋白质选自于由 AIM 片段、AIM 类似物、AIM 变异体以及 AIM 嵌合蛋白质组成的组 ;
- [0072] [18] 根据上述 [15]–[17] 中任意一项所述的治疗药剂, 其中, 上述 AIM 片段选自于包含 AIM 蛋白质的功能域及其保守区域的片段 ;
- [0073] [19] 根据上述 [12]–[18] 中任意一项所述的治疗药剂, 其中, 上述代谢综合症或

其相关疾病是从由代谢综合症、肥胖症、胰岛素抗性、糖尿病、高血脂症、高血压、动脉硬化疾病、肝脏疾病、肝失疏泄、脑血管疾病、局部缺血性心脏病、心力衰竭、痴呆症、脑溢血、神经症、肾脏疾病、脂肪细胞因子分泌异常以及血液游离脂肪酸量异常组成的组中选择的至少一种；

- [0074] [20] 根据上述 [12]–[19] 中任意一项所述的治疗药剂，其中，上述对象是人；
- [0075] [21] 根据上述 [12]–[19] 中任意一项所述的治疗药剂，其中，上述对象是非人类的哺乳动物或鸟类；
- [0076] [22] 根据上述 [21] 所述的治疗药剂，其中，上述对象是狗或猫；
- [0077] [23] 一种用于预防或治疗代谢综合症或其相关疾病的方法，该方法包括施用根据上述 [12]–[22] 中任意一项所述的治疗药剂的步骤；
- [0078] [24] 一种生产 AIM 抑制剂的方法，该方法包括：
- [0079] 用蛋白酶处理 AIM 以获得 AIM 片段的步骤，以及
- [0080] 通过其中固定有结合到 AIM 的功能域或保守区域的抗 AIM 抗体的亲和柱纯化上述 AIM 片段的步骤。
- [0081] 发明效果
- [0082] 根据本发明的方法，可以通过抑制 AIM 来抑制巨噬细胞浸润进入肥胖个体的脂肪组织中以在上游停止代谢综合症的致命疾病组的链式起始。

附图说明

- [0083] 图 1 示出了肥胖小鼠和正常小鼠的血液 AIM 浓度的测量结果。
- [0084] 图 2 示出了使用抗巨噬细胞单克隆抗体(F4/80)等检测巨噬细胞浸润进入肥胖 AIM^{+/+} 小鼠和肥胖 AIM^{-/-} 小鼠的内脏脂肪组织中的结果。
- [0085] 图 3 示出了在对 AIM^{-/-} 小鼠全身施用 rAIM3 周后使用抗巨噬细胞单克隆抗体(F4/80)等检测巨噬细胞浸润进入内脏脂肪组织中的结果。
- [0086] 图 4 示出了巨噬细胞迁移能力的测量结果。
- [0087] 图 5 是示出了用 HFD 饲喂 12 周之后的 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠的解剖学结果的照片。
- [0088] 图 6 示出了用 HFD 饲喂 12 周之后的 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠的体重和总脂肪量的结果。
- [0089] 图 7 示出了在饲喂 HFD 之前对 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠执行葡萄糖耐受性测试的结果。
- [0090] 图 8 示出了在饲喂 HFD 之后对 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠执行葡萄糖耐受性测试的结果。
- [0091] 图 9 示出了在饲喂 HFD 之前对 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠执行胰岛素耐受性测试的结果。
- [0092] 图 10 示出了在饲喂 HFD 之后对 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠执行胰岛素耐受性测试的结果。
- [0093] 图 11 示出了在饲喂 HFD 之后对 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠执行胰岛素敏感性测试的结果。

[0094] 图 12 示出了使用抗巨噬细胞单克隆抗体、抗小鼠 AIM 多克隆抗体和抗 IL-6 抗体对从正常小鼠(未饲喂高脂肪饮食的小鼠)和肥胖小鼠的内脏脂肪组织制得的切片染色的结果。

[0095] 图 13 示出了在 3T3-L1 细胞培养期间施用 rAIM 的时间表。

[0096] 图 14 示出了按照图 13 中示出的时间表在第 12 天用红油 O (oil-red-O) 对细胞染色的结果。

[0097] 图 15 示出了按照图 13 中示出的时间表在第 12 天通过定量实时 PCR 测量脂肪细胞标记的表达结果。

[0098] 图 16A 示出了施用 rAIM 并用红油 O 染色的成熟脂肪细胞的结果。图 16B 示出了脂滴的尺寸, 图 16C 示出了每单位面积的包含脂滴的细胞的数目。

[0099] 图 17 示出了通过对成熟脂肪细胞施用 rAIM 并测量培养上清液中的丙三醇和游离脂肪酸获得的测量结果。

[0100] 图 18 示出了通过对成熟脂肪细胞施用 rAIM 并通过定量实时 PCR 测量脂滴形成相关基因的表达获得的测量结果。

[0101] 图 19 示出了在施用 HFD20 天后 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠的脂肪组织切片的 HE 染色的结果。

[0102] 图 20A 示出了通过对分化或未分化 3T3-L1 细胞施用 rAIM 并针对 AIM、PPAR γ 2 和 DAPI 对细胞染色获得的结果。图 20B 示出了基于图 20A 的结果根据 PPAR γ 2 的表达水平对细胞分类并计算每 100 个每种细胞中包含 rAIM 的细胞的数目而获得的测量结果。图 20C 示出了通过对 3T3-L1 细胞施用 rAIM 并针对 AIM 和内含体或者 AIM 和溶酶体对细胞染色获得的结果。

[0103] 图 21 示出了使用金纳米粒子对 AIM 标记之后与图 20 的样品相同的样品的电子显微镜观察的结果。

[0104] 图 22 示出了通过使用 CD36 中和抗体处理 3T3-L1 细胞并检测 rAIM 对内吞作用的影响获得的结果。

[0105] 图 23 示出了通过对 CD36^{+/+} 小鼠和 CD36^{-/-} 小鼠静脉注射 rAIM 并对从脂肪组织制得的切片针对 AIM 和巨噬细胞进行染色而获得的结果。

[0106] 图 24 示出了通过注射对 AIM^{-/-} 小鼠的脂肪组织直接施用用 HA- 标签标记的 rAIM、使用脂肪组织通过抗 HA 抗体执行免疫共沉淀并通过免疫印记检测沉淀物中的 FAS 而获得的结果。

[0107] 图 25 示出了通过使用抗 F1ag 抗体或抗 HA 抗体的免疫共沉淀来证实用 HA 标签标记的 rAIM 和用 FLAG 标签标记的 FAS 在 HEK293T 细胞中的结合而获得的结果。

[0108] 图 26 示出了通过用 Flag 标签标记 FAS 的每个结构域、在稳定地表达 AIM-HA 的 HEK293T 细胞中进行表达并通过使用抗 Flag 抗体或抗 HA 抗体的免疫共沉淀来证实 FAS 和 AIM 的结合而获得的结果。

[0109] 图 27 示出了在存在或不存在 rAIM (5 μg/ml) 并存在 C75 (25 μM) 的情况下处理 6 天的 3T3-L1 细胞的 FAS 活性的测量结果。

[0110] 图 28 示出了 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠的脂肪组织中的 FAS 活性的测量结果。

[0111] 图 29 示出了在之前 3 小时通过局部注射到脂肪中施用 rAIM 或 BSA 的 AIM^{-/-} 小鼠

的脂肪组织的 FAS 活性的测量结果。

[0112] 图 30 示出了人源 AIM 的氨基酸序列和小鼠 AIM 的氨基酸序列及其之间的共有序列。

[0113] 图 31 是示出 FAS 结构的概念图。

[0114] 图 32 示出了用 HFD 喂饲 12 周的 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠的内脏脂肪量和皮下脂肪量的变化的测量结果。

[0115] 图 33 示出了 AIM^{-/-} 小鼠 5 周(在 5 周内,每周对小鼠施用 HFD 以及 rAIM 或 BSA 两次)的体重变化的测量结果。

[0116] 图 34 示出了 AIM^{-/-} 小鼠 5 周(在 5 周内,每周对小鼠施用 HFD 以及 rAIM 或 BSA 两次)的内脏脂肪量和皮下脂肪量的变化的测量结果。

[0117] 图 35 示出了在图 33 和图 34 中示出的实验之后的 AIM^{-/-} 小鼠的内脏脂肪中的脂肪细胞标记等的 mRNA 水平的测量结果。

[0118] 图 36 示出了通过免疫印迹对狗、猫和小鼠的血清中的 AIM 蛋白的检测结果。

[0119] 图 37 示出了通过基于 FSP27 表达的筛选获得的低分子量化合物的 AIM 抑制活性的评价结果。

[0120] 图 38 示出了通过基于 FSP27 表达的筛选获得的低分子量化合物的 AIM 抑制活性的评价结果。

[0121] 图 39 示出了通过基于 FSP27 表达的筛选获得的抗 AIM 抗体的 AIM 中和活性的评价结果。

[0122] 图 40 示出了经全面医学检查的大约 550 个患者的血液 AIM 浓度的测量结果。

[0123] 图 41 示出了随意选择的 BMI 为 18–25 或不小于 35 的献血者(包括外国人)的血液 AIM 浓度的测量结果。

具体实施方式

[0124] 本发明的用于预防或治疗代谢综合症及相关疾病的方法包含将 AIM 抑制剂施用到对象的步骤。

[0125] 在本说明书中,代谢综合症是表现为一系列疾病链的概念,该一系列疾病链通常从内脏脂肪型肥胖症(内脏脂肪积累)开始,然后通过脂肪组织的慢性炎症、来自脂肪细胞的脂肪细胞因子的分泌异常和血液游离脂肪酸的异常量等引起胰岛素抗性,其后引发诸如糖尿病、高血脂症和高血压等的与生活方式相关的疾病,最后发展为各种动脉硬化疾病。疾病链的下游可以包括肝脏疾病、肝失疏泄、脑血管疾病、局部缺血性心脏病、心力衰竭、痴呆症、脑溢血、神经症和肾脏疾病等。

[0126] 在本说明书中,代谢综合症及相关疾病包括基于在代谢综合症的发作或行进的机制中以及在代谢综合症的发作或行进的过程中产生的各种异常的任何疾病、症状和异常。例如,他们包括但不限于代谢综合症、肥胖症、胰岛素抗性、糖尿病、高血脂症、高血压、动脉硬化疾病、肝脏疾病(包括脂肪肝、肝癌)、肝失疏泄、脑血管疾病、局部缺血性心脏病、心力衰竭、痴呆症、脑溢血、神经症、肾脏疾病、脂肪细胞因子分泌异常和血液游离脂肪酸量异常。

[0127] 在本说明书中,以最广泛的意义和方式使用代谢综合症及相关疾病的预防或治

疗,例如,胰岛素抗性的预防、延迟或改善;代谢综合症及相关疾病的发作的预防、延迟或改善;与代谢综合症及相关疾病有关的一种或多种症状的缓解;代谢综合症及相关疾病的诊断标准中的各项值的改善;等等。

[0128] 作为代谢综合症的诊断标准的项的示例包括作为腹部肥胖的指标的腰部直径、血清甘油三酯值、HDL 胆固醇值、血压、空腹血糖水平、葡萄糖耐量、胰岛素抗性和尿白蛋白含量等。

[0129] 在本说明书中, AIM 抑制剂表示通过抑制 AIM 蛋白质的功能或表达来抑制机体中 AIM 蛋白质活性的物质。其示例包括但不限于低分子量化合物、高分子量化合物、肽、蛋白质和核酸等。

[0130] 在本说明书中,如上所述,“AIM”是作为 SRCR 超家族的成员的可溶性蛋白质。作为一个示例,在图 30 中示出了人类 AIM 和小鼠 AIM 的氨基酸序列。

[0131] 如下述的示例 10 中所示,在大部分健康个体(经过全面健康检查而无需医疗看护的个体)中,血液 AIM 浓度是 5–20 μg/mL。此外,如示例 11 中所示,具有 35 或更高 BMI 的对象与具有 18–25BMI 的对象相比,表现出显著高的血液 AIM 浓度。

[0132] 本发明的 AIM 抑制剂可以抑制任何种类的 AIM。例如,人类、人类之外的哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、猫、猪、牛、马、猴)以及鸟类等中的 AIM 同源蛋白质的抑制剂也相当于本发明的 AIM 抑制剂。本领域普通技术人员可以从高水平的序列相似性和功能分析来评价其他哺乳动物或鸟类中的蛋白质是否是 AIM 的同源蛋白质。例如,小鼠 AIM 和人类 AIM 之间的氨基酸序列的同源性高达大约 80%。另外,对于小鼠 AIM 和人类 AIM, SRCR 结构域中的共有序列(在具有 SRCR 结构域的诸如 CD5、CD6 等的其他分子中保守的氨基酸序列)完全相同。

[0133] 作为示例,在 SEQ ID NO:1、22、23、24 和 25 中分别示出了人类、黑猩猩、狗、小鼠和大鼠的 AIM 的氨基酸序列。

[0134] 另外,本发明的 AIM 抑制剂可以抑制 AIM 的类似物或变异体。AIM 的类似物和变异体的示例包括具有其中经过缺失、取代或添加一个至几个氨基酸的 AIM 的氨基酸序列并且保持 AIM 的功能的蛋白质。本领域普通技术人员可以通过高水平的序列相似性或功能分析来确定某个蛋白质是否是 AIM 的类似物或变异体。

[0135] 在本发明中, AIM 的受 AIM 抑制剂抑制的功能是指将巨噬细胞浸润进入脂肪组织中的功能以及对于巨噬细胞浸润进入脂肪组织中所需的并且由 AIM 直接或间接地表现的任何功能。对于巨噬细胞浸润进入脂肪组织中所需的并且由 AIM 直接或间接地表现的任何功能的示例包括在脂肪细胞表面上导致结合到 CD36 的功能;通过内吞作用导致进入脂肪细胞中的功能;在脂肪细胞中导致结合到 FAS 的功能;导致抑制 FAS 的酶活性的功能;导致促进脂滴融解的功能;通过脂滴融解引发巨噬细胞迁移的功能;等等。

[0136] 通过抑制 AIM 的这些功能中的任何功能,可以防止巨噬细胞浸润进入脂肪组织中,巨噬细胞浸润进入脂肪组织中导致脂肪组织和整个机体的慢性炎症。因此,即使是肥胖症,也不引发胰岛素抗性,并可以在上游停止代谢综合症疾病的链式发作。

[0137] (抑制 AIM 功能的 AIM 抑制剂)

[0138] 抑制 AIM 的功能的 AIM 抑制剂通过直接或间接地作用于 AIM 来抑制 AIM 的全部功能或部分功能。抑制 AIM 功能的机制的示例包括但不限于降低血液中 AIM 的稳定性、抑制

AIM 与 CD36 的结合、抑制 AIM 进入靶细胞中、抑制 AIM 从内含体转移到细胞质中以及抑制 AIM 与 FAS 的结合等。

[0139] 当施用降低血液中 AIM 的稳定性的抑制剂时, AIM 在短时间内被降解, 而未发挥其功能。

[0140] 当施用抑制 AIM 与 CD36 结合的 AIM 抑制剂时, 可以抑制 AIM 通过内吞作用进入靶细胞中, 由此可以抑制 AIM 的功能。

[0141] 作为抑制 AIM 与 CD36 结合的物质, 可以使用抑制蛋白质之间结合的任何物质, 例如可以使用抗 AIM 抗体和抗 CD36 抗体。如下述的参考示例中所示, 施用抗 CD36 抗体可以抑制 AIM 进入靶细胞中。对于抗 AIM 抗体, 将 AIM 对 CD36 的结合位点识别为抗原决定基的抗体是优选的。对于抗 CD36 抗体, 识别 CD36 对 AIM 的结合位点的抗体是优选的。

[0142] 本说明书中的“抗体”也包括抗体片段, 并可以是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 抗体、scFv、双特异性抗体以及合成抗体等。

[0143] 可以根据本领域普通技术人员已知的方法生产这些抗体。例如, 可以通过从用 AIM 免疫的非人类的哺乳动物中分离产生抗体的细胞, 将产生抗体的细胞与骨髓瘤细胞等融合以产生杂交瘤细胞, 并纯化由杂交瘤细胞产生的抗体来获得抗 AIM 的单克隆抗体。另外, 可以从用 AIM 免疫的动物的血清等中获得多克隆抗体。

[0144] 这里使用的用于免疫的 AIM 可以是全长或片段, 并且本领域普通技术人员可以合适地确定。当使用片段时, 它优选地包含对 CD36 的结合位点。

[0145] 另外, 当能够获得有效地抑制 AIM 对 CD36 的结合的非人源的单克隆抗体时, 也可以通过基因重组的方法生产抗体。例如, 从产生抗 AIM 单克隆抗体的杂交瘤细胞通过标准方法来制备总 RNA, 使用市售的试剂盒制备编码抗 AIM 抗体的 mRNA, 并使用逆转录酶合成 cDNA, 由此可以获得编码抗 AIM 抗体的 DNA。将包含该 DNA 的表达载体转染到合适的宿主细胞中并在合适的条件下培养宿主细胞以表达抗 AIM 抗体。

[0146] 另外, 还可以使用上述 cDNA 作为模版通过 PCR 方法来获得编码抗 AIM 抗体的 CDR 区域的 DNA。利用编码 CDR 区域的 DNA, 可以根据常规方法通过基因重组方法来生产人源抗体和人源化抗体。例如, 通过 PCR 方法来合成编码来源于非人源抗体的 CDR 区域的 DNA 和设计为连接到人源抗体的骨架区的 DNA, 再连接到编码人源抗体的恒定区的 DNA, 由此可以获得编码人源抗体的 DNA。

[0147] 根据已知的方法(利用限制酶的方法等)将这样的 DNA 插入到表达载体(例如, 质粒、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、诸如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒等的植物病毒、粘粒、YAC、来源于 EBC 的附加体)中, 将表达载体转染到合适的宿主细胞中以产生转化子。表达载体还可以包含调节抗体基因表达的启动子、复制起始点和选择标记基因等。可以根据宿主细胞和载体的种类合适地选择启动子和复制起始点。

[0148] 然后, 在合适的条件下培养转化子以表达抗 AIM 抗体的人源抗体。

[0149] 例如, 可以使用诸如哺乳动物细胞(CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞、HeLa 细胞、Vero 细胞等)、昆虫细胞、植物细胞、真菌细胞(酵母、曲霉等)的真核细胞以及诸如大肠杆菌(E. Coli)、枯草芽孢杆菌等的原核细胞作为宿主细胞。

[0150] 可以通过已知方法(例如, 使用蛋白质 A 等的亲和柱、其他的色谱柱、过滤、超滤、

盐析、透析等)的合适的组合来分离和纯化表达的抗体。

[0151] 当本发明的抗 AIM 抗体是诸如 Fab 片段、 $F(ab')_2$ 抗体和 scFv 等的低分子量的抗体时,也可以根据上述的方法,使用编码低分子量抗体的 DNA 表达抗体。另外,也可以通过使用诸如木瓜蛋白酶、胰蛋白酶等的酶的处理来生产抗体。

[0152] 也可以使用结合到抗 AIM 抗体并且不抑制 FAS 活性的蛋白质作为抑制 AIM 和 CD36 结合的 AIM 抑制剂。这样的蛋白质与 AIM 竞争性地结合到 CD36,并且抑制由于 AIM 结合到 CD36 而对 FAS 活性的抑制。

[0153] 结合到抗 AIM 抗体并且不抑制 FAS 活性的蛋白质的示例包括 AIM 片段、AIM 变异体或其片段以及 AIM 嵌合蛋白质或其片段。

[0154] 然而, AIM 片段不受具体限制,只要它包含 AIM 的部分肽,例如,可以使用包含 AIM 功能域或保守区域的 5-150 个氨基酸的片段。

[0155] 可以使用具有 AIM 的经过缺失、取代或添加 1-10 个氨基酸的氨基酸序列并且不抑制 FAS 活性的蛋白质作为 AIM 变异体。

[0156] AIM 嵌合蛋白质是指部分人源 AIM 蛋白质和来源于其他动物(例如小鼠)的 AIM 蛋白质的嵌合蛋白质。

[0157] 结合到抗 AIM 抗体并且不抑制 FAS 活性的蛋白质还包括 AIM 变异体或 AIM 嵌合蛋白质的片段。

[0158] 通过常规方法获得编码蛋白质的 DNA 并通过基因重组的方法使 DNA 表达蛋白质,这样可以表达结合到抗 AIM 抗体并且不抑制 FAS 活性的蛋白质。为了增加对 CD36 的亲和力和在血液中的稳定性,可以视情况改变和修改氨基酸序列。必要时,可以将蛋白质表达为与其他蛋白质和肽的融合蛋白质。

[0159] 另外,也可以通过生产每个全长蛋白质并用蛋白酶处理该蛋白质来获得 AIM 片段、AIM 变异体的片段和 AIM 嵌合蛋白质的片段。

[0160] 另外,也可以使用结合到 CD36 而不抑制 FAS 活性的蛋白质作为抑制 AIM 和 CD36 的结合的 AIM 抑制剂。这样的蛋白质与 AIM 竞争性地结合到 CD36,并且抑制因 AIM 结合到 CD36 而对 FAS 活性的抑制。

[0161] 结合到 CD36 而不抑制 FAS 活性的蛋白质的示例包括 AIM 片段、AIM 变异体或其片段以及 AIM 嵌合蛋白质或其片段。

[0162] 当施用抑制 AIM 进入靶细胞中的 AIM 抑制剂时,可以抑制 AIM 结合到靶细胞中的 FAS 并抑制其酶活性的功能。

[0163] 另外,抑制 AIM 从内含体转移到细胞质中的 AIM 抑制剂还抑制 AIM 结合到靶细胞中的 FAS 并抑制其酶活性的功能。

[0164] 当施用抑制 AIM 和 FAS 的结合的 AIM 抑制剂时,可以直接抑制 AIM 对 FAS 的作用,例如,可以使用结合到 FAS 并且不抑制 FAS 活性的蛋白质。这样的蛋白质与 AIM 竞争性地结合到 FAS,并且抑制因 AIM 结合到 FAS 而对 FAS 活性的抑制。

[0165] 对于这种的蛋白质,优选结合到从 DH、ER、TE 和 CC 组成的组中选择的至少一个 FAS 结构域的蛋白质。

[0166] 结合到 FAS 并且不抑制 FAS 活性的蛋白质的示例包括 AIM 片段、AIM 变异体或其片段以及 AIM 嵌合蛋白质或其片段。

[0167] 可以通过利用 AIM 抑制前脂肪细胞分化成为成熟脂肪细胞、引起脂肪细胞中的脂滴融解以及减小脂肪细胞的尺寸等事实的筛选方法从候选化合物中容易地选择上面解释的抑制 AIM 的功能的 AIM 抑制剂。

[0168] 例如,可以通过包括以下步骤的筛选方法容易地选择 AIM 抑制剂 :

[0169] (i)在用于分化成为脂肪细胞的条件下培养前脂肪细胞,并且仅将 AIM 或 AIM 与候选化合物加入培养基;

[0170] (ii)评价上述前脂肪细胞向脂肪细胞的分化;以及

[0171] (iii)选择与仅加入 AIM 相比,在与 AIM 一起加入时增加分化诱导效率的候选化合物。

[0172] 例如,可以使用脂肪细胞中脂滴的产生以及脂肪细胞标记、前脂肪细胞标记和 / 或间充质干细胞标记的表达作为指标来执行步骤(ii)。

[0173] 另外,可以通过包括以下步骤的筛选方法容易地选择 AIM 抑制剂 :

[0174] (a) 培养脂肪细胞,并且仅将 AIM 或 AIM 与候选化合物加入培养基;

[0175] (b) 评价上述脂肪细胞中的脂滴融解;以及

[0176] (c) 选择与仅加入 AIM 相比,在与 AIM 一起加入时降低脂滴融解效率的候选化合物。

[0177] 例如,可以使用脂肪细胞的培养上清液中的丙三醇或游离脂肪酸的量、脂滴形成相关基因的表达等作为指标来执行步骤(b)。

[0178] 另外,可以通过包括以下步骤的筛选方法容易地选择 AIM 抑制剂 :

[0179] (1) 培养脂肪细胞,并且仅将 AIM 或 AIM 与候选化合物加入培养基;

[0180] (2) 评价上述脂肪细胞的尺寸;以及

[0181] (3) 选择与仅加入 AIM 相比,在与 AIM 一起加入时增加脂肪细胞的尺寸的候选化合物。

[0182] 例如,可以通过细胞的伊红染色来执行步骤(2)。

[0183] 另外,AIM 抑制剂包括以下步骤:

[0184] 在候选化合物的存在或不存下在包括 AIM 的培养基中培养脂肪细胞或前脂肪细胞;以及

[0185] 评价在上述培养之后被摄入上述细胞中的 AIM。

[0186] 例如,可以在细胞培养步骤之后通过固定细胞、赋予渗透性、加入被标记的以允许检测的抗 AIM 抗体以及温育细胞来检测摄入细胞中的 AIM。

[0187] 当在候选化合物的存在下细胞中的所述摄入减少时,可以评价该候选化合物通过抑制 AIM 进入细胞中抑制了 AIM 的功能。

[0188] 另外,AIM 抑制剂包括以下步骤:

[0189] 在候选化合物存在或不存在下在包括 AIM 的培养基中培养脂肪细胞或前脂肪细胞;以及

[0190] 评价在上述细胞中 AIM 和 FAS 的结合。

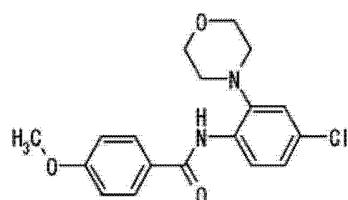
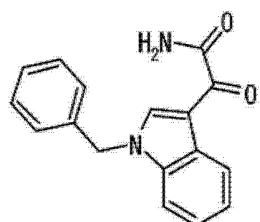
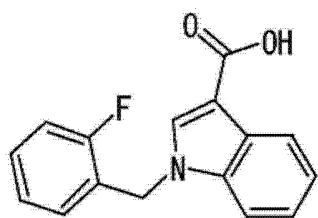
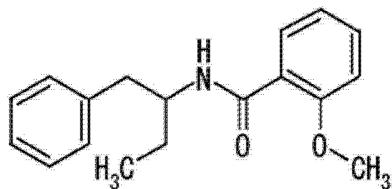
[0191] 例如,可以通过制备细胞裂解液、使用抗 AIM 抗体进行免疫沉淀以及使用抗 FAS 抗体对免疫沉淀物进行免疫印迹来确定 AIM 和 FAS 的结合。

[0192] 当在候选化合物的存在下 AIM 与 FAS 的结合减少时,可以评价该候选化合物通过

抑制 AIM 和 FAS 的结合来抑制 AIM 的功能。

[0193] 可以使用下面的化合物作为抑制 AIM 的功能的低分子量化合物。

[0194]



[0195] 如下述示例中所示,证实这些化合物显著地抑制了最初由 AIM 加入引发的脂滴形成相关基因 FSP27mRNA 的表达的明显降低,并且抑制了 AIM 的功能。

[0196] 还可以使用在下述示例 9 中产生的中和抗体(克隆 11、12 和 17)作为抑制 AIM 的功能的分子。这些中和抗体也被证实显著地抑制了最初由 AIM 加入引发的脂滴形成相关基因 FSP27mRNA 的表达的明显降低。

[0197] (抑制 AIM 表达的 AIM 抑制剂)

[0198] 抑制 AIM 表达的 AIM 抑制剂通过降低 AIM 在巨噬细胞中的表达水平来抑制 AIM 的全部功能或部分功能。

[0199] 抑制 AIM 表达的 AIM 抑制剂的示例包括对 AIM 基因具有 RNAi 作用的双链核酸、反义核酸、核酶以及编码它们的核酸。

[0200] RNAi 作用是由双链核酸引发的抑制序列特异性基因表达的机制。因为 RNAi 作用具有非常高的目标特异性并利用最初在体中存在的基因表达抑制机制,所以它是高度安全

的方法。

[0201] 例如,可以使用 siRNA 作为具有 RNAi 作用的双链核酸。当将 siRNA 用于哺乳动物细胞时,它是通常具有大约 19–30 个碱基,优选地大约 21–25 个碱基的双链 RNA。另外,也可以使用能够被酶(Dicer)切割成 siRNA 的更长的双链 RNA 作为本发明的 AIM 抑制剂。

[0202] 具有 RNAi 作用的双链核酸通常具有与靶核酸的一部分互补的一个碱基序列以及与其互补的另一个序列。具有 RNAi 作用的双链核酸通常在每个 3' 端具有两个突出的碱基(突出部分),但是也可以是不具有突出部分的平末端类型。例如,25 个碱基的平末端 RNA 的优势在于它最小化干扰素应答基因的激活、防止有义链引起的脱靶效应并且在血清中表现出非常高的稳定性,25 个碱基的平末端 RNA 还适合于体内使用。

[0203] 可以根据已知的方法基于靶基因的碱基序列设计具有 RNAi 作用的双链核酸。另外,具有 RNAi 作用的双链核酸也可以是双链 RNA、DNA–RNA 嵌合型双链核酸、人工核酸或具有各种修饰的核酸。

[0204] 反义核酸具有与靶基因(基本上是作为转录产物的 mRNA)互补的碱基序列,通常是具有 10 个碱基长 –100 个碱基长,优选地 15 个碱基长 –30 个碱基长的单链核酸。当将反义核酸导入细胞中时,通过与靶基因杂交抑制基因的表达。只要反义核酸提供了对靶基因表达的抑制作用,它可以不与靶基因完全互补。本领域普通技术人员可以通过使用已知的软件等合适地设计反义核酸。反义核酸可以是 DNA、RNA 和 DNA–RNA 嵌合体中的任何核酸,或者可以被修改。

[0205] 核酶是催化水解靶 RNA 的核酸分子,由具有与靶 RNA 互补的序列的反义区域和负责切割反应的催化中心区域组成。本领域普通技术人员可以根据已知的方法合适地设计核酶。核酶通常是 RNA 分子,也可以作为 DNA–RNA 嵌合体型分子使用。

[0206] 编码上述具有 RNAi 作用的双链核酸、反义核酸和核酶中的任何一种的核酸也可以用作本发明的 AIM 抑制剂。当将包含这样的核酸的载体导入巨噬细胞中时,表达表现出抑制 AIM 表达的作用的具有细胞内 RNAi 作用的双链核酸、反义核酸和核酶。

[0207] 对于编码具有 RNAi 作用的双链核酸的核酸,可以使用编码双链中的每个链的 DNA,或者也可以使用编码单链核酸(其中,双链核酸通过环连接)的 DNA。在后一种情况下,通过细胞内转录获得单链 RNA,并且其互补部分在分子内杂交以形成发夹型结构。这种 RNA 称作 shRNA(短发夹 RNA)。当将 shRNA 转移到细胞质中时,酶(Dicer)切割环以形成表现出 RNAi 作用的双链的 RNA。

[0208] 在本发明中的用于预防或治疗代谢综合症的方法中,将上述 AIM 抑制剂施用到对象。

[0209] 本说明书中的“对象”包括可以受到因 AIM 导致巨噬细胞浸润进入脂肪组织中而发生的代谢综合症侵袭的任何生物体,而不受具体限制。例如,可以是人类、人类之外的哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、猪、牛、马、猴)和鸟类等。

[0210] 例如,小鼠 AIM 和人类 AIM 表现出大约 80% 的高氨基酸序列同源性。另外,小鼠 AIM 和人类 AIM 在 SRCR 结构域中具有完全相同的共有序列(在具有 SRCR 结构域的诸如 CD5、CD6 等的其他分子中也保守的氨基酸序列),本发明的方法被认为对其他动物也有效。

[0211] 另外,近年来,诸如狗、猫等的宠物由于太多高脂肪饲喂和缺少运动而具有代谢综合症的问题。因此,本发明的方法对于这些动物也特别地有用。

[0212] 本发明的方法优选地用于血液 AIM 浓度高于正常水平的对象。如下述示例中所示，血液 AIM 浓度随着肥胖而增加。

[0213] 另一方面，本发明人迄今已经发现，当血液 AIM 浓度是中低浓度时，AIM 抑制脂肪组织中前脂肪细胞分化成为脂肪细胞，并促进脂滴融解。

[0214] 从这些发现中，我们可以说，当血液 AIM 浓度是中低时，AIM 在脂肪组织中表现出抗肥胖的作用，但是在高浓度时，AIM 将巨噬细胞引入脂肪组织中并引发脂肪组织的炎症。

[0215] 因此，当将 AIM 抑制剂用作预防或治疗代谢综合症的试剂时，对象的血液 AIM 浓度优选高于正常水平。

[0216] 在本发明中，可以全身或局部、口服或肠道外施用 AIM 抑制剂。例如，可以选择诸如滴注等的静脉注射、肌肉注射、腹腔内注射、皮下注射、栓剂、灌肠剂和口服肠道剂等，可以根据病人的年龄和症状选择合适的施用方法。

[0217] 另外，本发明的 AIM 抑制剂可以包含诸如防腐剂、稳定剂等的药学上可接受的载体。药学上可接受的载体是指可以与 AIM 抑制剂(活性成分)一起施用到对象的物质。药学上可接受的载体不受具体限制，只要它是药理上和药学上可接受的。其示例包括但不限于水、盐水、磷酸缓冲液、葡萄糖、丙三醇、诸如乙醇等的药学上可接受的有机溶剂、胶原、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、可水溶葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯树胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、双甘油、丙三醇、丙二醇、矿脂、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白、甘露醇、山梨醇、乳糖、表面活性剂、赋形剂、调味剂、防腐剂、稳定剂、缓冲剂、悬浮液、等渗剂、粘合剂、分散剂、润滑剂、流动性促进剂、矫味剂等。

[0218] 可以将本发明的 AIM 抑制剂制成药物制剂的常见形式。使用上述载体合适地制备药物制剂。药物制剂的形式不受具体限制，可以根据治疗目的合适地选择和使用药物制剂的形式。其代表性示例包括片剂、丸剂、散剂、溶液剂、悬液、乳剂、颗粒剂、胶囊剂、栓剂、注射剂(液体、悬浮液或乳状液)等。可以通过通常使用的方法生产这些制剂。

[0219] 当本发明的 AIM 抑制剂包含核酸时，可以通过将核酸封入诸如脂质体、聚合物胶束、阳离子载体等的载体中而制成。另外，也可以使用诸如精蛋白的核酸载体。另外，还优选将抗体等结合到载体以靶向患部。此外，还能够通过将胆固醇等结合到核酸来增强血液滞留。另外，当本发明的 AIM 抑制剂包含编码 siRNA 等并在施用后在细胞中表达的核酸时，也可以将核酸插入到诸如逆转录酶病毒、腺病毒、日本血凝病毒等的病毒载体或诸如脂质体等的非病毒载体中，并导入细胞内。

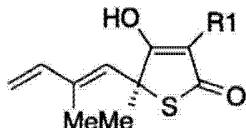
[0220] 另外，本领域技术人员可以根据活性成分的种类合适地确定包含在本发明的 AIM 抑制剂中的活性成分的量。例如，在诸如抗 AIM 抗体等的抗体的情况下，剂量可以是但不限于 0.025–50mg/kg，优选地 0.1–50mg/kg，更优选地 0.1–25mg/kg，进一步优选地 0.1–10mg/kg 或 0.1–3mg/kg。

[0221] 另外，本发明的 AIM 抑制剂还优选地与具有与 AIM 抑制剂相同的作用和效果的其他药剂(例如，抗动脉硬化药物、降脂药物和 FAS 抑制剂等)联合施用。可以与 AIM 抑制剂联合施用的药剂的示例包括但不限于从普罗布可、贝特类、他汀类、阿司匹林和昔布类组成的组中选择的至少一种抗动脉硬化药物，以及从 C75、C93、浅蓝菌素、PHS11A、2-辛酸、乳酶素和由以下式(1)表示的化合物(其中，R¹ 是氢原子或甲基或其药理上可接受的盐)组成的组

中选择的至少一种 FAS 抑制剂。

[0222] 式(1)

[0223]



[0224] 只要表现出叠加或协同效应，则联合施用不受施用的两种或多种药剂中每种药物的施用期和剂量的限制，它们可以同时或单独施用。

[0225] 如上所述，迄今 AIM 蛋白质已被认为引起对分化成脂肪细胞的抑制并引起脂滴融解(脂解作用)，它本身表现出抗肥胖的作用。如下述示例中所示，现在已经确认 AIM 蛋白质引发巨噬细胞浸润进入脂肪组织中。另外，研究表明，当将 AIM 蛋白敲除时，即使在内脏脂肪型肥胖症中，葡萄糖代谢也未加剧。

[0226] 因此，根据本发明的用于预防或者治疗代谢综合症的方法，施用 AIM 抑制剂防止 M1 巨噬细胞浸润进入脂肪组织中，以防止脂肪组织和整个机体的慢性炎症，因此，可以在其上游停止如多米诺效应般行进的疾病链。因此可以基本上预防和治疗代谢综合症。

[0227] 本发明还包括 AIM 抑制剂的生产方法。

[0228] AIM 抑制剂的生产方法包括用蛋白酶处理 AIM 以产生 AIM 的部分肽的步骤以及通过亲和柱纯化所述部分肽的步骤，在亲和柱中固定有结合到 AIM 的功能域或保守区域的抗 AIM 抗体。

[0229] 示例

[0230] 以下将基于不被解释为限制的示例详细地解释本发明。

[0231] 示例 1. 血液 AIM 浓度因肥胖症增加

[0232] 测量肥胖小鼠和正常小鼠的血清 AIM 浓度，其中，通过对 C57BL/6 (B6) 小鼠施用高脂肪饮食(HFD，脂肪热量 :60%) 20 周制备肥胖小鼠。图 1 中示出了结果。

[0233] 与正常小鼠(瘦的)的血清 AIM 浓度相比，肥胖小鼠(肥胖的)的血清 AIM 浓度是正常小鼠的 4 倍或更高。

[0234] 示例 2. 通过 AIM 诱导巨噬细胞浸润进入脂肪组织中

[0235] 从用 HFD 喂食而变胖的 AIM^{-/-} 小鼠和 AIM^{+/+} 小鼠收集内脏脂肪组织，用抗巨噬细胞单克隆抗体(F4/80)、抗小鼠 AIM 多克隆抗体(SA-1)和抗 IL-6 抗体(MP520F3, R&D 体系)对由脂肪组织制得的石蜡切片染色。

[0236] 图 2 中示出了结果。如图 2 中所示，浸润进入正常小鼠(AIM^{+/+})的脂肪组织中的 M1 巨噬细胞表达 AIM，但是在 AIM 敲除的小鼠(AIM^{-/-})中几乎没有发现巨噬细胞浸润进入脂肪组织中。

[0237] 如上所述，AIM 具有抑制巨噬细胞凋亡的功能。因此，当在 AIM 敲除小鼠的脂肪组织中没有检测到巨噬细胞时，有可能是巨噬细胞浸润进入脂肪组织中并发生凋亡。为了确认这种可能性，测量了肥胖的 AIM 敲除小鼠和肥胖的正常小鼠的脂肪组织中的巨噬细胞的凋亡。结果，它们的水平没有差异(数据未示出)。

[0238] 因此，确认在脂肪组织中没有检测到巨噬细胞是由于巨噬细胞没有浸润进入脂肪组织中。

[0239] 然后,通过静脉注射(50 μg/ 机体 / 注射)对 AIM 敲除小鼠全身施用 rAIM。在持续施用 3 周之后,用抗巨噬细胞单克隆抗体(F4/80)对由内脏脂肪组织制得的切片染色。

[0240] 图 3 中示出了结果。如图中所示,观察到对 AIM 敲除小鼠全身施用 rAIM 引起巨噬细胞浸润进入脂肪组织中。

[0241] 上述结果表明 AIM 引起巨噬细胞浸润进入脂肪组织中,因此,即使是内脏脂肪型肥胖症,对 AIM 抑制也可以抑制巨噬细胞浸润进入脂肪组织中。

[0242] 示例 3. 巨噬细胞迁移机制的说明

[0243] 分析小鼠巨噬细胞系 RAW264.8 (1×10^5 / 孔, 24 小时) 的迁移能力。

[0244] 使用 CytoSelect™96 孔细胞迁移分析仪(CELL BIOLABS 有限公司, 5mm, 荧光版)。图 4 中示出了结果。示出了通过从各 RFU 值减去背景(仅有培养基)而获得的值。脂肪酸鸡尾酒(Fatty Acids Cocktail)由肉豆蔻酸、软脂酸、油酸和亚油酸组成。

[0245] 使用通过培养来自分化诱导第 8 天的成熟 3T3-L1 脂肪细胞 6 天而获得的细胞上清液(3T3-L1CM)、通过与 rAIM 共培养(3T3-L1+AIM CM)而获得的上清液以及通过与 C75 共培养(3T3-L1+C75CM)而获得的上清液。CM : 条件培养基, ND : 未检测到。**:p<0.01

[0246] 如下述参考示例中所示,AIM 引起成熟脂肪细胞中的脂滴融解。因此,在培养上清液中释放有来自脂滴的游离脂肪酸和丙三醇。

[0247] 结合巨噬细胞迁移实验的结果,有力表明血液浓度伴随肥胖症而增加的 AIM 引起脂肪组织中的脂滴融解,这引起巨噬细胞浸润进入脂肪组织中。

[0248] 示例 4. 对肥胖的 AIM 敲除小鼠的葡萄糖代谢下降的抑制

[0249] 对野生型小鼠和 AIM 敲除小鼠施用 HFD12 周,并在施用前(瘦的)和施用后(肥胖的)通过葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验来测量葡萄糖代谢以及执行胰岛素敏感性试验。

[0250] 在葡萄糖耐量试验中,在施用葡萄糖(3g/kg 机体;腹腔内注射)之后 120 分钟内每 30 分钟测量血糖水平,在胰岛素耐量试验中,在施用胰岛素(0.75U/kg 机体;腹腔内注射)之后 120 分钟内每 30 分钟测量血糖水平。

[0251] 对用 HFD 喂饲后的 AIM^{+/+} 小鼠和 AIM^{-/-} 小鼠施用胰岛素(0.75U/kg 机体;腹腔内注射),2 小时后收集组织(白色脂肪组织、腓肠肌和肝脏),纯化蛋白质,并且通过免疫印迹测量磷酸化 AKT 和磷酸化 GSK3 β,由此执行胰岛素敏感性试验。

[0252] 另外,在喂饲 HFD 之后测量每只小鼠的体重和脂肪总量。

[0253] 图 5 示出了喂饲后的解剖学结果,图 6 示出了体重和脂肪总量的测量结果,图 7-图 10 示出了葡萄糖代谢的测量结果,图 11 示出了胰岛素敏感性试验的结果。

[0254] 如图 5 和图 6 中所示,喂饲 HFD 在 AIM 敲除小鼠(AIM^{-/-})和正常小鼠(AIM^{+/+})中都导致内脏脂肪型肥胖。在 AIM 敲除小鼠中,体重和脂肪组织量的增加更加显著。

[0255] 然而,如图 7-图 10 中所示,在肥胖的正常小鼠中,葡萄糖代谢显著下降,但在肥胖的 AIM 敲除小鼠中,葡萄糖代谢未下降。

[0256] 另外,如图 11 中所示,在施用胰岛素之后,在 AIM^{-/-} 小鼠中表达磷酸化 AKT 和磷酸化 GSK3 β,这证实通过胰岛素受体的信号转导起作用,即,胰岛素敏感性正常。另一方面,在野生型小鼠中没有检测到磷酸化 AKT 和磷酸化 GSK3 β,因此证实存在胰岛素抗性。

[0257] 另外,通过高胰岛素正葡萄糖钳夹试验也证实 AIM^{-/-} 小鼠具有正常的胰岛素敏感

性(数据未示出)。

[0258] 上述结果证明了在肥胖的 AIM 敲除小鼠中, 巨噬细胞没有浸润进入脂肪组织中, 因此抑制了脂肪组织和全身的炎症反应, 并且胰岛素敏感性没有下降。

[0259] 从肥胖的 AIM 敲除小鼠或肥胖的正常小鼠分离出胰腺中的胰岛, 通过施用葡萄糖测量胰岛素的产生和分泌。结果发现两者之间没有差异。因此, 证实了葡萄糖耐受性的差异不是基于胰岛素的产生或分泌, 而是基于胰岛素敏感性的差异。

[0260] 参考示例 1. 脂肪组织中的巨噬细胞中 AIM 的表达

[0261] 从瘦小鼠(瘦的)和肥胖小鼠(肥胖的)收集内脏脂肪组织, 其中, 瘦小鼠通过对野生型 B6 小鼠饲喂普通饲料而得到, 肥胖小鼠通过饲喂高脂肪饮食(HFD, 脂肪热量 60%)20 周而得到, 用抗巨噬细胞单克隆抗体(F4/80)、抗小鼠 AIM 多克隆抗体(SA-1)和抗 IL-6 抗体(MP520F3, R&D 体系)对由脂肪组织制得的石蜡切片双染色。

[0262] 图 12 示出了用荧光显微镜观察染色切片结果的一个示例。

[0263] 肥胖小鼠脂肪组织中的巨噬细胞用抗巨噬细胞抗体染色, 也用 AIM 特异性抗体染色(在肥胖的左侧)。因为 AIM 阳性巨噬细胞对 IL-6(在肥胖的右侧)也呈阳性, 所以它被认为是炎性巨噬细胞(M1)。

[0264] 另一方面, 从瘦小鼠收集的脂肪组织中的巨噬细胞对 AIM 和 IL-6 均呈阴性。

[0265] 为了证实 AIM 在脂肪细胞中不表达, 将来自肥胖小鼠的脂肪组织(附睾脂肪组织, 被用作典型的内脏脂肪组织)用胶原酶处理之后进行分离, 通过 RT-PCR 检测 AIM 的表达。然而, 在纯化的脂肪细胞中没有发现 AIM 的表达。另外, 用胰岛素、DEX 和 IBMX 处理 3T3-L1 细胞, 检测 AIM 的表达。结果, 未发现表达。

[0266] 上述结果证实了浸润进入脂肪组织中的巨噬细胞强烈地表达 AIM。

[0267] 参考示例 2. AIM 对前脂肪细胞分化成为脂肪细胞的抑制作用

[0268] [通过脂滴形成评价]

[0269] 为了检测由浸润进入脂肪组织中的巨噬细胞产生的 AIM 对周围脂肪细胞的作用, 执行实验以在 3T3-L1 前脂肪细胞分化成为成熟脂肪细胞的培养过程中加入 AIM。

[0270] 如图 13 中所示, 按照四个时间表 A-D 培养 3T3-L1 细胞。在(A)中, 不施用 AIM, 在(B)中, 从分化诱导刺激开始持续 10 天(第 2 天 - 第 12 天)施用 AIM, 在(C)中, 仅在分化诱导刺激的起始阶段(第 2 天 - 第 4 天)施用 AIM, 在(D)中, 仅在分化诱导之前的克隆扩增阶段(第 -2 天 - 第 2 天)施用 AIM。

[0271] 对于 AIM, 使用重组的小鼠 AIM 蛋白质(rAIM)。通过在无血清培养基(FreeStyleTM293 表达培养基; Invitrogen)中培养用表达小鼠 AIM 的载体(pCAGGS-mAIM-HA 质粒)转染的来自人的 HEK293T 细胞来制备 rAIM。在下面示出的其他参考示例中, 使用的 AIM 是相似的 rAIM 蛋白质。通过将 AIM 以 5 μg/ml 的浓度加入培养基来施用 AIM。

[0272] 另外, 如图 13 中所示, 通过培养 4 天(第 -2 天 - 第 2 天)来首先扩增 3T3-L1 细胞, 之后在包含胰岛素、地塞米松(DEX)和异丁基甲基黄嘌呤(IBMX)的培养基中培养 2 天(第 2 天 - 第 4 天)以开始分化诱导刺激, 在包含胰岛素的培养基中进一步培养 2 天(第 4 天 - 第 6 天)来诱导 3T3-L1 细胞的分化。

[0273] 在分化诱导刺激期(第 2 天 - 第 6 天)之后, 在不含这些分化诱导刺激因子的培养基中连续地培养细胞。然后用红油 O 对处于从分化诱导刺激开始那天起第 10 天(第 12 天)

的细胞染色,观察 3T3-L1 细胞分化成为成熟脂肪细胞的状态。

[0274] 图 14 示出了 4 个时间表 A-D 的各染色细胞的显微照片。

[0275] 如图 14 中所示,当按照时间表 C 仅在分化诱导刺激的起始阶段(第 2 天 - 第 4 天)施加 AIM 时,几乎观察不到具有脂滴的细胞,3T3-L1 细胞的分化几乎被完全抑制。换言之,在前述分化诱导物的存在下,AIM 抑制 3T3-L1 细胞的分化。

[0276] 即使在制备培养基之后使用纯化柱从包含分化诱导物和 AIM 的培养基中除去 AIM 时,所述分化诱导物分化 3T3-L1 细胞的能力也未失去(数据未示出)。因此,认为在分化诱导物和 AIM 之间不存在实质性的化学相互作用。

[0277] 另外,当按照时间表 B 从分化诱导刺激开始持续 10 天(第 2 天 - 第 12 天)施用 AIM 时,几乎观察不到具有脂滴的细胞,3T3-L1 细胞的分化几乎被完全抑制。另外,确认了 AIM 的这种分化抑制作用依赖于 AIM 的浓度(数据未示出)。当将施用于 3T3-L1 细胞的 AIM 的浓度降低至 1 μ g/ml 和 0.1 μ g/ml 时,AIM 的分化抑制作用也下降。

[0278] 另外,死细胞的数量没有由于施加 AIM 而增加。因此,认为 AIM 对分化的抑制没有引起细胞死亡,而使分化成为成熟脂肪细胞的 3T3-L1 细胞的数量降低。

[0279] 另一方面,当按照时间表 D 仅在分化诱导之前(第(-2)天 - 第 2 天)施加 AIM 时,确认了几乎所有细胞都具有脂滴,并且几乎所有 3T3-L1 细胞都分化成为成熟脂肪细胞,就像按照时间表 A 不施加 AIM 的情况一样。即,即使仅在分化诱导之前施加 AIM 时,3T3-L1 细胞分化成为成熟脂肪细胞也未受到抑制。然而,当从分化诱导之前直至分化诱导期和分化诱导期之后(第(-2)天 - 第 12 天)连续地施加 AIM 时,3T3-L1 细胞向脂肪细胞的分化被完全抑制(数据未示出)。

[0280] 当将人源 rAIM 用于 AIM 的施加时,来自小鼠的 3T3-L1 细胞的分化受到类似的抑制,这表明 AIM 的功能在人类和小鼠之间是可互换的。

[0281] [通过脂肪细胞标记的表达进行评价]

[0282] 在从分化诱导刺激开始的第 10 天(第 12 天)回收按照图 13 中示出的时间表 A-D 培养的细胞,并使用 7500 快速实时 PCR (7500Fast Real-Time PCR) 系统(Invitrogen;CA, USA)通过 $\Delta \Delta C_t$ 方法测量脂肪细胞标记(C/EBP α、PPAR γ 1、PPAR γ 2、CD36、Glut4)在 mRNA 水平的表达。表 1 中示出了使用的引物。

[0283] 表 1

[0284]

f-PPARY1	CAAGAATACCAAAGTGCGATCAA (SEQ ID NO :2)
r-PPARY1	GAGCTGGGTCTTTCAGAATAATAAG (SEQ ID NO :3)
f-PPARY2	CCAGAGCATGGTGCCTTCGCT (SEQ ID NO :4)
r-PPARY2	CAGCAACCATTGGGTCAAGCTC (SEQ ID NO :5)
f-C/EBP α	AGCAACGAGTACCGGGTACG (SEQ ID NO :6)
r-C/EBP α	TGTTTGGCTTTATCTGGCTC (SEQ ID NO :7)

f-CD36	TTGTACCTATACTGTGGCTAAATGAGA (SEQ ID NO :8)
r-CD36	CTTGTGTTTGAACATTCTGCTT (SEQ ID NO :9)
f-Glut4	GACGGACACTCCATCTGTTG (SEQ ID NO :10)
r-Glut4	GCCACGATGGAGACATAGC (SEQ ID NO :11)

[0285] 图 15 中示出了结果。表明按照时间表 A 和 D, 脂肪细胞标记得到表达并且前脂肪细胞分化成为脂肪细胞。另一方面, 按照其中与分化诱导刺激同时施用 AIM 的时间表 B 和 D, 脂肪细胞标记的表达受到抑制, 表明向脂肪细胞的分化受到抑制。该结果与时间表 A 和 D 中形成脂滴以及时间表 B 和 D 中未形成脂滴是一致的。

[0286] 如上所述, AIM 抑制前脂肪细胞分化成为脂肪细胞。另外, 通过观察脂滴的形成或者检测脂肪细胞标记、前脂肪细胞标记或间充质干细胞标记, 可以容易地检测分化水平。

[0287] 因此, 根据脂滴形成或标记检测, 当与单独加入 AIM 相比, 将 AIM 与候选化合物一起加入使分化诱导效率增加时, 可以评价所述候选化合物为抑制 AIM 的功能的化合物, 当分化诱导效率降低时, 可以评价所述候选化合物促进了 AIM 的功能。

[0288] 参考示例 3. AIM 对脂肪细胞的脂滴融解的功能

[0289] [通过红油 O 进行评价]

[0290] 按照图 13 中 E 示出的时间表对分化的 3T3-L1 细胞施用 rAIM(5 μ g/ml)。在施用 rAIM 之前和施用 rAIM 之后执行红油 O 染色。图 16A 中示出了典型的照片。施用 rAIM 之后培养 6 天(rAIM (+)), 细胞中的脂滴显著下降。

[0291] 通过 50 个脂滴的平均直径确定脂滴的相对尺寸(相对脂滴尺寸)。误差条示出了标准误差。在 5 个不同区域测量单位面积包含脂滴的细胞的数目, 并确定平均值。图 16B、图 16C 中示出了各结果。

[0292] 脂滴的相对尺寸和包含脂滴的细胞的数目显著下降。

[0293] 结果表明 rAIM 引起脂滴融解, 脂滴中包含的丙三醇和游离脂肪酸被释放到上清液中。

[0294] [通过培养上清液中的丙三醇或游离脂肪酸的量进行评价]

[0295] 对 3T3-L1 脂肪细胞施加 rAIM (5 μ g/ml), 并在第 2 天、第 4 天和第 6 天测量释放到培养上清液中的丙三醇或游离脂肪酸的量。在施加 rAIM 之后, 用 PBS 洗涤细胞两次, 并在无血清培养基(FreeStyle™293 表达培养基; Invitrogen)中温育 5 个小时。回收缓冲液, 使用丙三醇测定试剂盒和脂肪酸测定试剂盒(都来自 Bio Vision 有限公司)按照手册执行测量。

[0296] 图 17 中示出了结果。当在培养之前加入 rAIM 时, 培养上清液中的丙三醇和游离脂肪酸的量显著增加。

[0297] 结果表明 rAIM 引起脂滴融解, 包含在脂滴中的丙三醇和游离脂肪酸被释放到上清液中。

[0298] [通过脂滴形成相关基因的表达进行评价]

[0299] 对 3T3-L1 脂肪细胞施加 rAIM (5 μ g/ml), 并在第 2 天、第 4 天和第 6 天使用 7500

快速实时 PCR 系统(Invitrogen ;CA, USA)通过 $\Delta \Delta C_t$ 方法(每次 n=3)测量脂滴形成相关基因(FSP27、围脂滴蛋白和脂肪分化相关蛋白(Adipophilin))的 mRNA。

[0300] 类似地,还测量了前脂肪细胞标记 PREF-1 的 mRNA。用 GAPDH 将测量值标准化。表 2 中示出了使用的引物。

[0301] 表 2

[0302]

f-Fsp27	CTGGAGGAAGATGGCACAAATCGTG (SEQ ID NO :12)
r-Fsp27	CAGCCAATAAAGTCCTGAGGGTTCA
f-Perilipin	TGCTGGATGGAGACCTC (SEQ ID NO :14)
r-Perilipin	ACCGGCTCCATGCTCCA (SEQ ID NO :15)
f-Adipophilin	AAGCATCGGCTACGACGACAC (SEQ ID NO :16)
r-Adipophilin	GGACAGTCTGGCATGTAGTCTGGA (SEQ ID NO :17)
f-GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG (SEQ ID NO :18)
r-GAPDH	GGATGCAGGGATGATGTTCT (SEQ ID NO :19)
f-PREF1	CGGGAAATTCTGCGAAATAG (SEQ ID NO :20)
r-PREF1	TGTGCAGGAGCATTGTA (SEQ ID NO :21)

[0303] 图 18 中示出了结果。用第 0 天 1.0 的相对表达水平确定相对表达水平。误差条示出了标准误差。

[0304] 在 rAIM 处理之后的第 2 天,脂滴形成相关基因的表达已显著下降。另一方面,在 rAIM 处理期间,前脂肪细胞标记的表达没有增加。这表明 AIM 没有导致成熟脂肪细胞的去分化。

[0305] 如上所述,AIM 融解成熟脂肪细胞中的脂滴。通过用显微镜观察、测量培养上清液的丙三醇或游离脂肪酸水平以及测量脂滴形成相关基因的表达等可以容易地检测脂滴融解的水平。

[0306] 因此,根据培养上清液中丙三醇等的检测,当与单独加入 AIM 相比,将 AIM 与候选化合物一起加入使脂滴融解效率下降时,可以评价所述候选化合物为抑制 AIM 的功能的化合物,当脂滴融解效率增加时,可以评价所述候选化合物为促进 AIM 的功能。

[0307] 参考示例 4. AIM 减小脂肪细胞尺寸的功能

[0308] [通过 HE 染色进行评价]

[0309] 用高脂肪饮食(HFD)饲喂 AIM^{+/+} 小鼠(+/-)和 AIM^{-/-} 小鼠(-/-) (参见非专利文献 1) 20 天,用 HE 对脂肪组织的切片进行染色。在显微镜的不同区域中,测量 50 个脂肪细胞的距离,并确定平均值 ± 标准误差。图 19A 中示出了结果,图 19B 中示出了典型照片。与 AIM^{+/+} 小鼠相比,AIM^{-/-} 小鼠的脂肪细胞明显大。

[0310] 如上所述, AIM 减小了脂肪细胞的尺寸。通过显微镜可以容易地检测减小的水平。

[0311] 因此, 根据尺寸的测量, 当与单独加入 AIM 相比, 将 AIM 与候选化合物一起加入使细胞尺寸增大时, 可以评价所述候选化合物为抑制 AIM 的功能的化合物, 当细胞尺寸减小时, 可以评价所述候选化合物为促进 AIM 的功能。

[0312] 参考示例 5. 在细胞表面上通过 CD36 将 AIM 摂入脂肪细胞中

[0313] 将分化的 3T3-L1 细胞(胰岛素 /DEX/IBMX 刺激(+))和未分化的 3T3-L1 细胞(胰岛素 /DEX/IBMX 刺激(-))与 rAIM (5 μg/ml)温育 3 个小时, 并利用 AIM、PPAR γ 2 和 DAPI 染色。对于利用 PPAR γ 2 染色, 使用兔抗 PPAR γ 2 多克隆抗体(Abcam plc)。图 20A 中示出了结果。

[0314] 上部示出了利用 AIM 和 DAPI 对细胞核染色的结果, 中部示出了利用 AIM 和 PPAR γ 2 染色的结果, 下部示出了利用 AIM、PPAR γ 2 和 DAPI 染色的相衬图像的结果。观察到 AIM 分散在脂肪细胞的细胞质中。

[0315] 从下部组所清楚的是, 高效表达 PPAR γ 2 的细胞包含许多脂滴。高效表达 PPAR γ 2 的细胞是充分分化的成熟脂肪细胞。表示为“pre”的右侧示出了未经分化诱导刺激的未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞。

[0316] 图 20B 示出了通过根据 PPAR γ 2 的表达水平对细胞分类而获得的每 100 个细胞中包含 rAIM 的细胞的数目。如图中所示, 发现高效表达 PPAR γ 2 的成熟脂肪细胞表现出有效的 rAIM 摂入, 而低表达 PPAR γ 2 的未充分分化的细胞表现出显著低的 rAIM 摂入效率。未经分化诱导刺激的前脂肪细胞(pre)表现出不摄入 rAIM。

[0317] 另外, 用 rAIM 对 3T3-L1 脂肪细胞处理 3 个小时, 利用 AIM 和内含体(使用 FM1-43FX (Invitrogen 公司))、AIM 和溶酶体(使用 Lysotracker Red DND-99 (Invitrogen 公司))进行染色, 并在共聚焦显微镜下观察。图 20C 中示出了结果。

[0318] 包含到脂肪细胞中的 rAIM 与内含体共定位, 未观察到与溶酶体的共定位。

[0319] 使用相同的样品, 用金纳米颗粒标记 AIM, 并在电子显微镜下观察。具体地, 用多聚甲醛固定经正常羊血清预处理 30 分钟的细胞, 并与 SA-1 兔抗 AIM 多克隆抗体(1:600 稀释)过夜温育。然后, 将它们同与 1nm 金纳米颗粒(1:200; Nanopropes 有限公司)共价结合的羊抗兔 IgG 反应。使用 HQ 银(Nanopropes 有限公司)对细胞进行银增强、锇酸固定、脱水并直接在环氧树脂(Nissin EM 公司)中包埋。制备超薄切片, 用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 用电子显微镜(H-7100; Hitachi 有限公司)观察。

[0320] 图 21 中示出了结果。E 表示内含体, P 表示吞噬体或吞噬溶酶体, M 表示线粒体, N 表示细胞核, LD 表示脂滴。

[0321] 用金纳米颗粒标记的 rAIM 具有类似内含体的结构, 具体地, 聚集在其界膜附近(左上)。在细胞膜中, 观察到 rAIM 的内吞作用(中上)。细胞核附近发现一些包含 rAIM 的颗粒, 认为是晚期内含体(右上)。晚期内含体变性, 并与 rAIM 一起释放到细胞质中。

[0322] 在直径大且形状不规则的吞噬体或吞噬溶酶体、线粒体和脂滴中没有检测到 AIM(下部)。

[0323] 上述结果共同表明, AIM 通过内吞作用进入脂肪细胞中, 并在细胞中发挥功能。

[0324] 然后, 说明参与 AIM 摂入的细胞表面分子。由于 CD36 促进脂蛋白、脂肪酸等的摄入, 并且在脂肪细胞和巨噬细胞(AIM 发挥作用的目标)中都表达, 所以关注 CD36。

[0325] 用 CD36 中和抗体(Abcam 公共有限公司 ;Clone JC63. 1 小鼠 IgA) 处理 3T3-L1 脂肪细胞以抑制 rAIM 的内吞作用。图 22 示出了用中和抗体处理和不用中和抗体处理的典型照片以及每 100 个细胞中包含 rAIM 的细胞的数目。

[0326] 如图中所示,用 CD36 中和抗体的处理显著地抑制了 rAIM 的摄入。

[0327] 然后,对 CD36^{+/+} 小鼠(野生型) 和 CD36^{-/-} 小鼠(Febbraio 等人,J. Biol. Chem., 1999, 274:19055-19062) 静脉注射 rAIM (300 μg/ 小鼠,在 PBS 中),16 小时后杀死小鼠,从脂肪组织制备切片。对切片中的 AIM 和巨噬细胞 F4/80 进行染色。图 23 中示出了结果。

[0328] 如图中所示,在 CD36^{-/-} 脂肪细胞中, AIM 的信号显著下降,在 CD36^{+/+} 脂肪细胞中,丧失了摄入 rAIM 的能力。

[0329] 这些结果有力表明 CD36 引起 rAIM 的摄入。

[0330] 如上所述, AIM 通过细胞表面上的 CD36 进入脂肪细胞中。例如,通过使用可检测的标记抗 AIM 抗体使细胞内 AIM 可视化,可以容易地检测脂肪细胞摄入 AIM 的水平。

[0331] 因此,使用这种方法,可以阐明候选化合物抑制 AIM 的功能的作用机制,并且可以证实所述化合物的效果。

[0332] 例如,当与单独加入 AIM 相比,将 AIM 与抑制 AIM 的功能的候选化合物一起加入使 AIM 的细胞内摄入降低时,可以认为所述候选化合物通过抑制 AIM 的细胞内摄入抑制了 AIM 的功能。

[0333] 参考示例 6. AIM 与 FAS 的结合

[0334] [通过免疫沉淀反应进行评价]

[0335] 对 AIM^{+/+} 小鼠的脂肪组织直接注射用 HA 标签标记的 rAIM (在若干个点,总共 100 μg)。3 小时后,为了确定 rAIM-HA 与内源 FAS 的结合,使用脂肪组织执行用抗 HA 抗体的免疫共沉淀。通过免疫印迹(WB) 分析沉淀中 FAS 的存在。

[0336] 图 24 中示出了结果。如图中所示,确定 FAS 和 rAIM 共沉淀,进入的 AIM 与细胞质中的 FAS 结合。

[0337] 在 HEK293T 细胞中,用 HA 标签标记的 rAIM 和用 FLAG 标签标记的 FAS 共表达,通过使用抗 Flag 抗体或抗 HA 抗体的共免疫沉淀确定了 AIM 与 FAS 的结合。

[0338] 图 25 中示出了结果。rAIM 和 FAS 共沉淀,表明了 AIM 结合到 FAS 的能力。

[0339] 然后,检测 AIM 在 FAS 中的结合区域。FAS 包含酮酰基合成酶(KS)、丙二酰 / 乙酰转移酶(MAT)、脱水酶(DH)、中心核(CC)、烯酰基还原酶(ER)、酮基还原酶(KR)、酰基载体蛋白(ACP) 和硫酯酶(TE) 8 个结构域。

[0340] 图 31 中示出了 FAS 的结构。

[0341] 用 Flag 序列标记 FAS 每个结构域的 N 端,并在 HEK293T 细胞中表达,其中,HEK293T 细胞稳定地表达 AIM-HA。通过使用抗 Flag 抗体或抗 HA 抗体的共免疫沉淀确定 AIM-HA 与 FAS 每个结构域的结合。

[0342] 图 26 中示出了结果。发现结合到 AIM 的结构域是 ER、DH、TE 和 CC。

[0343] 使用由 Ohara 博士(Kazusa DNA 研究机构) 提供的 cDNA 克隆的一部分以及通过 RT-PCR 和 pFLAG-CMV2 载体(Sigma) 克隆的一些片段来构建编码用 FLAG 标签标记的全长 FAS cDNA (核苷酸 :+1-7515) 的序列。

[0344] 通过使用全长FAS cDNA作为模版,亚克隆到pFLAG-CMV2载体来制备编码KS、MAT、DH、CC、ER、KR、ACP或TE的cDNA片段。

[0345] [AIM对FAS酶活性的抑制]

[0346] 检测AIM对脂肪细胞或脂肪组织的FAS活性的影响。通过稍作改变的Kelley方法(Kelley等人,Biochem.J.,1986,235:87-90)测量FAS活性。将3T3-L1脂肪细胞或肥胖小鼠脂肪组织的裂解物与乙酰辅酶A和NADPH(包含0.4mM EDTA的0.2M钙磷酸缓冲液[PH7.0])混合,将混合物放置在分光光度计比色皿中,并保持在30°C。加入20μl丙二酰辅酶A溶液(0.2mM)以开始酶反应,并以2cm/min的走纸速度(chart speed)测量OD的下降。基于结果,使用摩尔消光系数为6220的氧化NADPH评价FAS酶活性。

[0347] 首先,测量在存在或不存在rAIM(5μg/ml)并且存在C75(25μM)的情况下处理6天的3T3-L1细胞的FAS活性。图27中示出了结果。另外,图28和图29中分别示出了AIM^{+/+}小鼠和AIM^{-/-}小鼠的脂肪组织的FAS活性以及在之前3小时通过脂肪内局部注射施用rAIM或BSA的AIM^{-/-}小鼠的脂肪组织的FAS活性。

[0348] 用HFD饲喂所有小鼠20周。溶解(裂解)样品并测量FAS活性。根据使用相同样品执行WB的结果,将数据转换为基于FAS蛋白质的数据。在每个组中,n是6,误差条示出了标准误差。

[0349] 如图27中所示,rAIM处理显著地抑制了3T3-L1脂肪细胞中的FAS活性。抑制水平与特异性抑制FAS的C75的抑制水平相同。

[0350] 与AIM^{+/+}小鼠相比,AIM^{-/-}小鼠体内脂肪组织显著增加(图28)。另外,对AIM^{-/-}小鼠的脂肪组织直接施用rAIM降低了FAS活性。

[0351] 如上所述,AIM结合到FAS并抑制其活性。

[0352] 通过免疫沉淀反应等可以容易地检测AIM与FAS的结合水平。因此,使用这种方法,可以阐明候选化合物抑制AIM的功能的作用机制,并且可以证实所述化合物的效果。例如,当与单独加入AIM相比,将AIM与抑制AIM的功能的候选化合物一起加入使AIM与FAS的结合下降时,认为所述候选化合物通过抑制AIM与FAS的结合抑制了AIM的功能。

[0353] 通过测量FAS活性的常规方法可以容易地检测对活性的抑制水平。因此,使用这种方法,可以阐明候选化合物抑制AIM的功能的作用机制,并且可以证实所述化合物的效果。例如,当与单独加入AIM相比,将AIM与抑制AIM的功能的候选化合物一起加入抑制了对FAS活性的抑制时,认为所述候选化合物通过抑制AIM对FAS活性的抑制功能抑制了AIM的功能。

[0354] 参考示例 7. AIM 改变体重和脂肪量(体内)

[0355] 用HFD饲喂AIM^{+/+}小鼠(n=7)和AIM^{-/-}小鼠(n=6)12周,测量内脏脂肪量和皮下脂肪量的改变。图32中示出了结果。内脏脂肪(附睾脂肪组织)和皮下脂肪的增加量在AIM^{-/-}小鼠中更大。

[0356] 然后,对AIM^{-/-}小鼠腹腔施用(每周两次)rAIM(n=6;300μg/注射/小鼠)5周,同时用HFD饲喂,测量体重和脂肪组织量。图33和34中示出了结果。与施用牛血清蛋白(n=5;300μg/注射/小鼠)的对照相比,rAIM施用组在体重、内脏脂肪和皮下脂肪所有方面的增加明显小。

[0357] 通过QPCR测量在从rAIM施用组和BSA施用组的小鼠的内脏脂肪组织提取的RNA

中的脂肪细胞标记、前脂肪细胞标记和脂滴形成相关基因的 mRNA 水平。图 35 中示出了结果。用 GAPDH 的测量值将测量值标准化，并且通过与施用 BSA 的脂肪组织的表达水平相对的表达水平示出了测量值。

[0358] 在 rAIM 施用组中，内脏脂肪中的 FSP27、围脂滴蛋白和脂肪分化相关蛋白的 mRNA 水平也低。另一方面，PREF-1 的 mRNA 水平通过施用 rAIM 而增加，但 PPAR γ 2、C/EBP α 和 GLUT4 的 mRNA 在 rAIM 施用组和 BSA 施用组之间未表现出差异。

[0359] 参考示例 8. 狗和猫中 AIM 的表达

[0360] 通过以下筛选方法寻找 AIM 抑制剂

[0361] < 细胞 >

[0362] 3T3-L1 (DS Biopharma, 产品号为 EC86052701)

[0363] < 试剂 >

[0364] . 培养基

[0365] 用于传代 ... DMEM (Invitrogen, 产品号为 11995-081) / 10%CS/PS SM

[0366] 用于测定 ... DMEM/10%FBS/ 青霉素 + 链霉素

[0367] 用于分化诱导 ... DMEM/10%FBS/ 青霉素 + 链霉素 / 1 μ g/mL 胰岛素 / 1 μ M 地塞米松 / 0.5mM IBMX

[0368] . RT-PCR TaqMan 基因表达 Cells-to-Ct 试剂盒 (Applied Biosystems, 产品号为 AM1729)

[0369] . 探针小鼠 FSP27, 小鼠 GAPDH (Applied Biosystems, 产品号为 AM1729)

[0370] . mAIM

[0371] 将在 37°C 下使用自由型 CHO 表达培养基 (Invitrogen, 产品号为 12651-014) 悬浮培养的 CHO-S 细胞制备为 10^6 细胞 / mL, 加入 DMSO 至终浓度为 1.25%，并在 37°C 下悬浮培养 3 小时。将 His6 标签加至小鼠 mAIM 的 C 末端，用表达质粒转染 CHO-S 细胞，在表达质粒中，mAIM 和 His6 标签连接到 CMV 或 PGK 启动子的下游。在 37°C 下培养细胞 2 小时之后，改变温度至 29°C，当使用 CMV 启动子时继续培养 7 天，当使用 PGK 启动子时继续培养 9 天，回收培养上清液。将回收的培养上清液用于 HisTrap HP 柱 (5mL, GE Healthcare 制造)，用 20mM 咪唑洗涤柱子并用 300mM 咪唑洗提 mAIM。用 PBS 取代回收的溶液并浓缩以得到纯化的 mAIM。

[0372] < 测试化合物 >

[0373] . 10mM 测试化合物，在 DMSO 中

[0374] < 方法 >

[0375] (1) 细胞传代

[0376] . 用 PBS (-) 洗涤在平皿中培养的细胞，用 1/10 浓度的胰蛋白酶剥离，在传代培养基中悬浮并对细胞进行计数。

[0377] . 通常，在 10cm 平皿中以 5×10^5 - 1×10^6 个细胞 / 平皿传代细胞。

[0378] . 在新的 10cm 平皿中种植细胞。

[0379] 对于每隔一天的传代，以 2×10^5 个细胞 / 平皿种植细胞，

[0380] 对于每隔两天的传代，以 1×10^5 个细胞 / 平皿种植细胞。

[0381] (2) 分化诱导

[0382] - 第 1 天

[0383] . 用 PBS (-) 洗涤在平皿中培养的细胞, 用 1/10 浓度的胰蛋白酶剥离, 对分析培养基中悬浮的细胞计数。

[0384] . 将细胞制备成 5×10^4 个细胞 / mL, 并以 100 μ L/ 孔 (5000 个细胞 / 孔) 在 96 孔板 (IWAKI) 中种植。

[0385] - 第 3 天

[0386] . 制备添加有 mAIM (最终浓度 400 μ g/mL) 的分化诱导培养基和稀释的测试化合物 (终浓度 10 μ M)。

[0387] . 除去 96 孔板的培养基, 并加入上述分化诱导培养基 (100 μ L/ 孔)。

[0388] - 第 5 天

[0389] . 除去培养基, 用冷却至 4°C 的 PBS (-) 以 100 μ L/ 孔洗涤。

[0390] . 以 25 μ L/ 孔加入裂解缓冲液 (+1/100DNA 酶), 通过板震荡仪完全裂解细胞 (室温下 1 分钟)。

[0391] . 将细胞在室温下静置 5 分钟。

[0392] . 以 2.5 μ L/ 孔加入终止液, 通过板震荡仪混合混合物 (室温下 2 分钟)。

[0393] (3) RT-PCR 测定

[0394] 在 96 孔 PCR 板中制备以下逆转录反应溶液。

[0395]

2×RT 缓冲液 10

20×RT 酶混合物 1

[0396]

无核酸酶的水 5

细胞裂解物 4

总计 20 μ L/孔

[0397] . 逆转录反应

[0398] 37° C 60 分钟

[0399] 95° C 5 分钟

[0400] 4° C 保持

[0401] . 在 384 孔 PCR 板中制备以下 RT-PCR 反应溶液。

[0402]

TaqMan 基因表达混合物 5

20×TaqMan 探针 (mFSP27) 0.5

20×TaqMan 探针 (mGAPDH) 0.5

无核酸酶的水 2

cDNA 样品 2

总计 10 μ L/孔

[0403] . 通过 ABI7900HT 执行 RT-PCR 反应。

[0404] 50° C 2 分钟

[0405] 95° C10 分钟

[0406] 40 个循环的以下反应

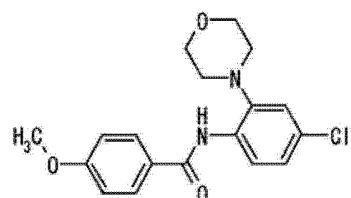
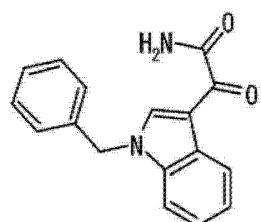
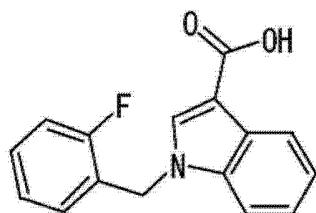
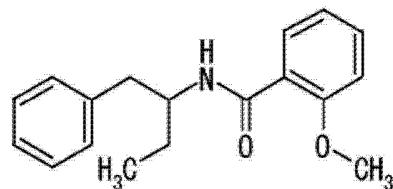
[0407] 95° C15 秒

[0408] 60° C1 分钟

[0409] 用 1280 种化合物($n=1, 10 \mu\text{m}$)执行初步筛选，并测量 FSP27 的表达水平(通过 GAPD 标准化)。取 32 个数据点(来自每个 96 孔板的前 2 个数据点)作为初次筛选结果，其中，该 32 个数据点表现出不大于 (-)AIM+3SD 筛选结果的活性。

[0410] 执行再现性试验($n=3, 10 \mu\text{m}, 4$ 组 AIM)，选择在所有 4 组 AIM 蛋白质中表现出激活的 FSP27 表达水平(通过 GAPD 标准化)不小于 (+)AIM+3×SD 的化合物。选择了以下化合物，按顺序是 DST-1, DST-2, DST-3 和 DST-4。

[0411]



[0412] 图 37、图 38 中示出了 DST-1-DST-4 的再现性试验的结果。证实了全部化合物显著地抑制由加入 AIM 引起的 FSP27 mRNA 表达的显著下降，抑制了 AIM 的功能。

[0413] 示例 9. 中和抗体

[0414] 通过以下材料和方法制备中和抗体。

[0415] <动物免疫>

[0416] 作为抗原,将小鼠 AIM (2mg/mL) 与等量 TiterMax Gold (G-1Funakoshi) 混合以得到乳剂。使用两只 6 周大的雌性 Jcl:Wistar 大鼠(CLEA Japan 有限公司)作为待免疫动物,将 50 μL 施用到后肢足底区域。2 周之后,执行相似的施用,并且在 2 周或更长时间之后对足底区域施用抗原溶液(50 μg)以为 3 天后的细胞融合做准备。

[0417] <骨髓瘤细胞>

[0418] 使用小鼠 P3U1 作为骨髓瘤细胞,使用通过将谷氨酰胺和丙酮酸加入 RPMI1640 (11875-119GIBCO) 并将 FBS (S1560BWT 有限公司) 加至 10% 而制备的培养基作为生长培养基。加入适量的青霉素或链霉素作为抗生素。

[0419] <细胞融合>

[0420] 在麻醉下,从大鼠提取心脏血液,无菌地分离脾淋巴结,放置于具有 #200 筛网的烧杯上并通过用硅棒推动制备细胞悬浮液。通过两次离心使用 RPMI1640 洗涤细胞,并计数。

[0421] 通过离心收集对数生长期的骨髓瘤细胞、洗涤、制备为相对于淋巴细胞为 5:1,并进行混合离心。

[0422] 使用 PEG1500 (783641Roche) 执行细胞融合。即,将 1mL 的 PEG 溶液与细胞团反应 3 分钟,将反应混合物逐步稀释,并通过离心洗涤。加入培养基,将 200 μL 混合物加入 96 孔板(15 个板),并培养 1 周。使用添加有 HAT 补充剂(21060-017GIBCO)并且 FBS 浓度被调节至 15% 的用于骨髓瘤细胞的培养基作为培养基。

[0423] <收集小鼠腹水>

[0424] 解冻冷藏保存的细胞,执行生长培养,将 1×10^7 个细胞施用到在不少于 1 周前腹腔施用 0.5ml 朴日斯烷(42-002COSMO BIO)的裸鼠(BALB/cAJcl-nu/nu CLEA Japan 有限公司)的腹腔,并在大约 2 周之后获得 4-12ml 腹水。通过离心处理除去固体并将腹水冷藏保存。

[0425] <电泳分析>

[0426] 解冻腹水,用 5 μm 过滤器处理,通过醋酸纤维素薄膜电泳确定包含在腹水中的单克隆抗体的条带。

[0427] 电泳条件是 pH8.6 的 0.05M 巴比妥钠缓冲液(020-13415Wako Pure Chemical Industries 股份有限公司)、SELECA-V(ADVANTEC)、1mA/cm、25 分钟,执行固定,并使用 0.1% 苯胺黑(2% 乙酸)染色。

[0428] <抗体检测>

[0429] 在室温下用 rAIM 处理每份浓度是 200mg/mL 的 24 份抗小鼠 AIM 大鼠单克隆抗体 30 分钟,然后以 5mg/mL 的 rAIM 终浓度加入分化的 3T3-L1 脂肪细胞(分化诱导的第 4 天),并培养 24 小时。从细胞中分离出 RNA,通过定量 RT-PCR 对 FSP27 的 mRNA 量进行定量。

[0430] 图 39 中示出了结果。

[0431] 在克隆 11、克隆 12 和克隆 17 的 3 个克隆中,显著地抑制了原本由加入 rAIM 诱导的 FSP27mRNA 表达的显著下降。在大鼠 IgG 对照中和用克隆 15 的处理中没有被抑制。

[0432] 示例 10. 测量经过医学检查的对象的血液 hAIM 浓度

[0433] 除了使用人源 rAIM 作为抗原之外,以与示例 9 中的方法相同的方法获得抗 AIM 抗

体。

[0434] 对于获得的克隆,根据布达佩斯条约的规定将 AIM-CL-6 和 AIM-CL-7 保藏。保藏号分别是 NITE BP-1092 和 NITE BP-1093。

[0435] 保藏处:独立行政法人(Incorporated Administrative Agency)技术评价国家机构(National Institute of Technology and Evaluation)专利微生物保藏中心(Patent Microorganisms Depositary)(NPMD :National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary ;2-5-8Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japan)。

[0436] 保藏日期:2011 年 5 月 2 日

[0437] 使用 AIM-CL-6 和 AIM-CL-7 测量经医学检查的大约 550 个对象的血液 hAIM 浓度。具体地,使用用于捕获的 AIM-CL-6、用于检测的 AIM-CL-7 和血清(50 μ L),一式两份执行分析。顺序稀释人源 rAIM 以建立标准曲线,由此确定浓度。

[0438] 通过在 HEK293T 细胞中生产用 HA 标签标记的人源 AIM 蛋白质,并使用抗 HA 抗体从培养上清液中柱纯化该蛋白质来获得人源 rAIM。

[0439] 图 40 中示出了结果。

[0440] 示例 11. BMI 和血液 AIM 浓度之间的关系

[0441] 从献血者(包括外国人)中随意选择 BMI 为 18-25 或不小于 35 的献血者,并通过与图 6 中的方法相似的方法测量血液 AIM 浓度。通常, BMI 越高被认为代谢综合症的风险越高。

[0442] 图 41 中示出了结果。与 BMI 为 18-25 的献血者相比,在 BMI 不小于 35 的献血者中,血液 AIM 浓度显著要高。这有力表明血液 AIM 浓度与代谢综合症的风险相关,并且对 AIM 抑制能够预防或治疗代谢综合症。

[0443] [序列表自由文本]

[0444] SEQ ID NO:1 是人源 AIM 的氨基酸序列。

[0445] SEQ ID NO:2 是用于通过实时定量 PCR 分析 PPAR γ 1 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0446] SEQ ID NO:3 是用于通过实时定量 PCR 分析 PPAR γ 1 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0447] SEQ ID NO:4 是用于通过定量实时 PCR 分析 PPAR γ 2 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0448] SEQ ID NO:5 是用于通过定量实时 PCR 分析 PPAR γ 2 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0449] SEQ ID NO:6 是用于通过定量实时 PCR 分析 C/EBP α 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0450] SEQ ID NO:7 是用于通过实时定量 PCR 分析 C/EBP α 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0451] SEQ ID NO:8 是用于通过实时定量 PCR 分析 CD36 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0452] SEQ ID NO:9 是用于通过实时定量 PCR 分析 CD36 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0453] SEQ ID NO:10 是用于通过实时定量 PCR 分析 GLUT4 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0454] SEQ ID NO:11 是用于通过实时定量 PCR 分析 GLUT4 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0455] SEQ ID NO:12 是用于通过实时定量 PCR 分析 Fsp27 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0456] SEQ ID NO:13 是用于通过实时定量 PCR 分析 Fsp27 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0457] SEQ ID NO:14 是用于通过实时定量 PCR 分析 围脂滴蛋白表达的正向引物的 DNA 序列。

[0458] SEQ ID NO:15 是用于通过实时定量 PCR 分析 围脂滴蛋白表达的反向引物的 DNA 序

列。

[0459] SEQ ID NO:16 是用于通过实时定量PCR分析脂肪分化相关蛋白表达的正向引物的 DNA 序列。

[0460] SEQ ID NO:17 是用于通过实时定量PCR分析脂肪分化相关蛋白表达的反向引物的 DNA 序列。

[0461] SEQ ID NO:18 是用于通过实时定量 PCR 分析 GAPDH 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0462] SEQ ID NO:19 是用于通过实时定量 PCR 分析 GAPDH 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0463] SEQ ID NO:20 是用于通过实时定量 PCR 分析 PREF1 表达的正向引物的 DNA 序列。

[0464] SEQ ID NO:21 是用于通过实时定量 PCR 分析 PREF1 表达的反向引物的 DNA 序列。

[0465] SEQ ID NO:22 是黑猩猩 AIM 的氨基酸序列。

[0466] SEQ ID NO:23 是狗 AIM 的氨基酸序列。

[0467] SEQ ID NO:24 是小鼠 AIM 的氨基酸序列。

[0468] SEQ ID NO:25 是大鼠 AIM 的氨基酸序列。

[0001]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt
序列表

<110> 宮崎彻 (Miyazaki, Toru) , 大日本住友制药株式会社 (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)

<120> 通过抑制AIM预防和治疗代谢综合症的方法

<130> T0529ACP0007

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 347

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<223> 人源AIM蛋白质的氨基酸序列

<400> 1

Met Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ile Leu Ala Ile Cys Thr Arg Pro Gly
1 5 10 15

Phe Leu Ala Ser Pro Ser Gly Val Arg Leu Val Gly Gly Leu His Arg
20 25 30

Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu Gln Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val
35 40 45

Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ile Lys Asp Val Ala Val Leu Cys Arg Glu
50 55 60

Leu Gly Cys Gly Ala Ala Ser Gly Thr Pro Ser Gly Ile Leu Tyr Glu
65 70 75 80

Pro Pro Ala Glu Lys Glu Gln Lys Val Leu Ile Gln Ser Val Ser Cys
85 90 95

Thr Gly Thr Glu Asp Thr Leu Ala Gln Cys Glu Gln Glu Glu Val Tyr
100 105 110

Asp Cys Ser His Asp Glu Asp Ala Gly Ala Ser Cys Glu Asn Pro Glu
115 120 125

Ser Ser Phe Ser Pro Val Pro Glu Gly Val Arg Leu Ala Asp Gly Pro
130 135 140

Gly His Cys Lys Gly Arg Val Glu Val Lys His Gln Asn Gln Trp Tyr
145 150 155 160

Thr Val Cys Gln Thr Gly Trp Ser Leu Arg Ala Ala Lys Val Val Cys
165 170 175

Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Arg Cys Asn
180 185 190

Lys His Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Ile Trp Leu Ser Gln Met Ser Cys
195 200 205

[0002]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt

Ser	Gly	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Cys	Pro	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly
210						215								220	
Lys	Asn	Thr	Cys	Asn	His	Asp	Glu	Asp	Thr	Trp	Val	Glu	Cys	Glu	Asp
225						230				235				240	
Pro	Phe	Asp	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Asn	Leu	Cys	Ser	Gly	Arg
							245			250				255	
Leu	Glu	Val	Leu	His	Lys	Gly	Val	Trp	Gly	Ser	Val	Cys	Asp	Asp	Asn
					260			265					270		
Trp	Gly	Glu	Lys	Glu	Asp	Gln	Val	Val	Cys	Lys	Gln	Leu	Gly	Cys	Gly
						275		280				285			
Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Arg	Asp	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Gly
					290		295				300				
Val	Gly	Arg	Ile	Trp	Leu	Asp	Asn	Val	Arg	Cys	Ser	Gly	Glu	Gln	
					305		310			315				320	
Ser	Leu	Glu	Gln	Cys	Gln	His	Arg	Phe	Trp	Gly	Phe	His	Asp	Cys	Thr
						325			330				335		
His	Gln	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Ile	Cys	Ser	Gly					
					340		345								
<210>	2														
<211>	23														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	通过实时定量PCR分析PPAR γ 1表达中使用的正向引物的DNA序列														
<400>	2														
	caagaataacc	aaagtgcgat	caa											23	
<210>	3														
<211>	26														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	通过实时定量PCR分析PPAR γ 1表达中使用的反向引物的DNA序列														
<400>	3														
	gagctgggtc	ttttcagaat	aataag											26	
<210>	4														
<211>	21														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	通过实时定量PCR分析PPAR γ 2表达中使用的正向引物的DNA序列														
<400>	4														
	ccagagcatg	gtgccttgcg	t											21	
<210>	5														
<211>	21														
<212>	DNA														

[0003]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt		
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	通过实时定量PCR分析PPAR γ 2表达中使用的反向引物的DNA序列	
<400>	5 cagcaacat tgggtcagct c	21
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	通过实时定量PCR分析C/EBP α 表达中使用的正向引物的DNA序列	
<400>	6 agcaacagttt accgggtacg	20
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	通过实时定量PCR分析C/EBP α 表达中使用的反向引物的DNA序列	
<400>	7 tgtttggcatt tatctcggtt c	21
<210>	8	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	通过实时定量PCR分析CD36表达中使用的正向引物的DNA序列	
<400>	8 ttgtacctat actgtggcta aatgaga	27
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	通过实时定量PCR分析CD36表达中使用的反向引物的DNA序列	
<400>	9 cttgcgtttt gaacattttt gttt	24
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	通过实时定量PCR分析GLUT4表达中使用的正向引物的DNA序列	
<400>	10 gacggacact ccatactgttg	20
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	通过实时定量PCR分析GLUT4表达中使用的反向引物的DNA序列	

[0004]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt			
<400>	11	gccaagatgg agacatagc	19
<210>	12		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	通过实时定量PCR分析Fsp27表达中使用的正向引物的DNA序列		
<400>	12	ctggaggaaat atggcacaat cgtg	24
<210>	13		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	通过实时定量PCR分析Fsp27表达使用的反向引物的DNA序列		
<400>	13	cagccaaataa agtcctgagg gttca	25
<210>	14		
<211>	17		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	通过实时定量PCR分析脂滴蛋白表达中使用的正向引物的DNA序列		
<400>	14	tgcgtggatgg agacccctc	17
<210>	15		
<211>	17		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	通过实时定量PCR分析脂滴蛋白表达中使用的反向引物的DNA序列		
<400>	15	acccggcttca tgccttca	17
<210>	16		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	通过实时定量PCR分析脂肪分化相关蛋白表达中使用的正向引物的DNA序列		
<400>	16	aaggcatcgcc taacgacgaca c	21
<210>	17		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	通过实时定量PCR分析脂肪分化相关蛋白表达中使用的反向引物的DNA序列		
<400>	17	ggacagtctg gcatgttagtc tgga	24

[0005]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt

<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223> 通过实时定量PCR分析GAPDH表达中使用的正向引物的DNA序列		
<400>	18	
aactttggca ttgtggaagg		
20		
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223> 通过实时定量PCR分析GAPDH表达中使用的反向引物的DNA序列		
<400>	19	
ggatgcaggg atgatgttct		
20		
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223> 通过实时定量PCR分析PREF1表达中使用的正向引物的DNA序列		
<400>	20	
cgggaaattc tgcgaaatag		
20		
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223> 通过实时定量PCR分析PREF1表达中使用的反向引物的DNA序列		
<400>	21	
tgtcaggag cattegtact		
20		
<210>	22	
<211>	347	
<212>	PRT	
<213>	黑猩猩 (Pan troglodytes)	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223> 黑猩猩AIM蛋白质的氨基酸序列		
<400>	22	
Met Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ile Leu Ala Ile Cys Thr Arg Pro Gly		
1	5	10
15		
Phe Leu Ala Ser Pro Ser Gly Val Arg Leu Val Gly Gly Leu His Arg		
20	25	30
Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu Gln Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val		
35	40	45
Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ile Lys Asp Val Ala Val Val Cys Arg Glu		
50	55	60

[0006]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt

Leu	Gly	Cys	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Ser	Gly	Ile	Leu	Tyr	Glu
65						70					75			80	
Pro	Pro	Ala	Glu	Lys	Glu	Gln	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Ser	Val	Ser	Cys
								85			90			95	
Thr	Gly	Thr	Glu	Asp	Thr	Leu	Ala	Gln	Cys	Glu	Gln	Glu	Glu	Val	Tyr
						100			105			110			
Asp	Cys	Ser	His	Asp	Glu	Asp	Ala	Gly	Ala	Ser	Cys	Glu	Asn	Pro	Glu
							115		120			125			
Ser	Ser	Phe	Ser	Pro	Val	Pro	Glu	Gly	Val	Arg	Leu	Ala	Asp	Gly	Pro
							130		135		140				
Gly	His	Cys	Lys	Gly	Arg	Val	Glu	Val	Lys	His	Gln	Asn	Gln	Trp	Tyr
						145		150		155		160			
Thr	Val	Cys	Gln	Thr	Gly	Trp	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Lys	Val	Val	Cys
							165		170			175			
Arg	Gln	Leu	Gly	Cys	Gly	Arg	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Lys	Arg	Cys	Asn
							180		185			190			
Lys	His	Ala	Tyr	Gly	Arg	Lys	Pro	Ile	Trp	Leu	Ser	His	Met	Ser	Cys
							195		200			205			
Ser	Gly	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	Gln	Asp	Cys	Pro	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly
							210		215			220			
Lys	Asn	Thr	Cys	Asn	His	Asp	Glu	Asp	Thr	Trp	Val	Glu	Cys	Glu	Asp
							225		230		235		240		
Pro	Phe	Asp	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Asn	Leu	Cys	Cys	Gly	Arg
							245		250			255			
Leu	Glu	Val	Leu	His	Lys	Gly	Val	Trp	Gly	Ser	Val	Cys	Asp	Asp	Asn
							260		265			270			
Trp	Gly	Glu	Lys	Glu	Asp	Gln	Val	Val	Cys	Lys	Gln	Leu	Gly	Cys	Gly
							275		280			285			
Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Arg	Asn	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Gly
							290		295			300			
Val	Gly	Arg	Ile	Trp	Leu	Asp	Asn	Val	Arg	Cys	Ser	Gly	Glu	Gln	
							305		310		315		320		
Ser	Leu	Glu	Gln	Cys	Gln	His	Arg	Phe	Trp	Gly	Phe	His	Asp	Cys	Thr
							325		330			335			
His	Gln	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Phe	Cys	Ser	Val					
							340		345						
<210>	23														
<211>	340														
<212>	PRT														

[0007]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt

<213> 狗 (Canis familiaris)

<220>

<221> misc_feature

<223> 狗AIM蛋白的氨基酸序列

<400> 23

Met	Ala	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly
1						5					10			15	

Phe	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser	Arg	Val	Arg	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	His	Arg
		20					25				30				

Cys	Glu	Gly	Arg	Val	Glu	Val	Gln	Arg	Tyr	Gly	Glu	Trp	Gly	Thr	Ile
		35			40				45						

Cys	Asp	Asp	Gly	Trp	Asp	Ile	Lys	Asp	Val	Ala	Val	Val	Cys	Arg	Glu
	50				55				60						

Leu	Asp	Cys	Gly	Val	Ala	Lys	Arg	Ala	Leu	Ser	Gly	Thr	Leu	Phe	Gly
65					70				75		80				

Pro	Pro	Thr	Gln	Gln	Gln	Lys	Ile	Phe	Ile	Gln	Gln	Val	Lys	Cys	
		85				90				95					

His	Gly	Met	Glu	Glu	Asn	Leu	Ser	Gln	Cys	Glu	Glu	Asp	Ala	Phe	
		100				105				110					

Asp	Cys	Thr	His	Asp	Glu	Asp	Ala	Gly	Val	Val	Cys	Gly	Phe	Pro	Glu
		115				120				125					

Asn	Val	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	His	Lys	Arg	Cys	Gln	Gly	Arg	Val	Glu
	130				135				140						

Val	Lys	Gln	Gln	Gly	Gln	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Lys	Gly	Ser	Trp	Asn
145				150				155				160			

Phe	Ala	Ala	Ala	Lys	Val	Val	Cys	Gln	Val	Gly	Cys	Gly	Arg	Ala	
				165				170			175				

Ile	Leu	Thr	Arg	Lys	Cys	Cys	Asn	Lys	Ala	Thr	Gln	Gly	Gln	Gly	Pro
		180			185				190						

Ile	Trp	Pro	Arg	Lys	Val	Ser	Cys	Ser	Gly	Lys	Glu	Ile	Ser	Leu	Gln
		195			200				205						

Asp	Cys	Pro	Ser	Glu	Val	Trp	Glu	Lys	Asn	Asn	Cys	Thr	His	Asp	Glu
		210			215				220						

Asp	Met	Trp	Val	Glu	Cys	Glu	Asp	Pro	Phe	Asp	Leu	Lys	Leu	Val	Gly
225				230				235			240				

Gly	Asp	Ser	Pro	Cys	Ala	Gly	Arg	Leu	Glu	Val	Leu	His	Lys	Gly	Glu
		245			250			255							

Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	Asp	Asp	Trp	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Gln	Val
		260			265			270							

[0008]

MSP12I1127W-sequence+listing[1].txt

Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Ala Ser Leu Ser Pro Ser Val Lys
275 280 285

Phe Arg Arg Arg Phe Gly Pro Gly Val Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asp
290 295 300

Val Ala Cys Ser Gly Asn Glu Arg Ser Leu Glu Gln Cys Arg His Arg
305 310 315 320

Phe Trp Gly His His Asn Cys Lys His Thr Glu Asp Val Ala Val Val
325 330 335

Cys Ala Glu Gln
340

<210> 24
<211> 352
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>
<221> misc_feature
<223> 小鼠AIM蛋白质的氨基酸序列

<400> 24

Met Ala Pro Leu Phe Asn Leu Met Leu Ala Ile Leu Ser Ile Phe Val
1 5 10 15

Gly Ser Cys Phe Ser Glu Ser Pro Thr Lys Val Gln Leu Val Gly Gly
20 25 30

Ala His Arg Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu His Asn Gln Gln Trp
35 40 45

Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Asp Arg Arg Asp Val Ala Val Val
50 55 60

Cys Arg Glu Leu Asn Cys Gly Ala Val Ile Gln Thr Pro Arg Gly Ala
65 70 75 80

Ser Tyr Gln Pro Pro Ala Ser Glu Gln Arg Val Leu Ile Gln Gly Val
85 90 95

Asp Cys Asn Gly Thr Glu Asp Thr Leu Ala Gln Cys Glu Leu Asn Tyr
100 105 110

Tyr Val Phe Asp Cys Ser His Glu Glu Asp Ala Gly Ala Gln Cys Glu
115 120 125

Asn Pro Asp Ser Asp Leu Leu Phe Ile Pro Glu Asp Val Arg Leu Val
130 135 140

Asp Gly Pro Gly His Cys Gln Gly Arg Val Glu Val Leu His Gln Ser
145 150 155 160

Gln Trp Ser Thr Val Cys Lys Ala Gly Trp Asn Leu Gln Val Ser Lys

[0009]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt

165	170	175
Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Leu Leu Thr Tyr Gly		
180	185	190
Ser Cys Asn Lys Asn Thr Gln Gly Lys Gly Pro Ile Trp Met Gly Lys		
195	200	205
Met Ser Cys Ser Gly Gln Glu Ala Asn Leu Arg Ser Cys Leu Leu Ser		
210	215	220
Arg Leu Glu Asn Asn Cys Thr His Gly Glu Asp Thr Trp Met Glu Cys		
225	230	235
Glu Asp Pro Phe Gln Leu Lys Leu Val Gly Gly Asp Thr Pro Cys Ser		
245	250	255
Gly Arg Leu Glu Val Leu His Lys Gly Ser Trp Gly Ser Val Cys Asp		
260	265	270
Asp Asn Trp Gly Glu Lys Glu Asp Gln Val Val Cys Lys Gln Leu Gly		
275	280	285
Cys Gly Lys Ser Leu His Pro Ser Pro Lys Thr Arg Lys Ile Tyr Gly		
290	295	300
Pro Gly Ala Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asp Val Asn Cys Ser Gly Lys		
305	310	315
Glu Gln Ser Leu Glu Phe Cys Arg His Arg Leu Trp Gly Tyr His Asp		
325	330	335
Cys Thr His Lys Glu Asp Val Glu Val Ile Cys Thr Asp Phe Asp Val		
340	345	350
<210> 25		
<211> 346		
<212> PRT		
<213> 褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)		
<220>		
<221> misc_feature		
<223> 大鼠AIM蛋白质的氨基酸序列		
<400> 25		
Met Ala Leu Leu Phe Asn Leu Ile Leu Ala Leu Leu Thr Ile Phe Val		
1	5	10
15		
Gly Leu Cys Phe Ser Glu Ser Pro Thr Arg Val Arg Leu Val Gly Gly		
20	25	30
Ala His Arg Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Lys His Asn Gly Gln Trp		
35	40	45
Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Asp Leu Ile Asp Val Ser Val Val		
50	55	60

[0010]

MSP1211127W-sequence+listing[1].txt

Cys	Arg	Glu	Leu	Asn	Cys	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Thr	Pro	Ser	Gly	Ala
65					70				75						80
Ser Tyr His Pro Pro Ala Ser Glu Gly Gln Ser Val Leu Ile Gln Gly															
					85				90						95
Val Glu Cys Ser Gly Ala Glu Asp Met Leu Ala Gln Cys Thr Leu Asn															
					100				105						110
Tyr Asp Val Phe Asp Cys Ser His Ala Glu Asp Ala Gly Val Gln Cys															
					115				120						125
Glu Asn Pro Asp Asn Pro Glu Asn Val Arg Leu Val Glu Gly Leu Gly															
					130				135						140
Arg Cys Gln Gly Arg Leu Glu Val Phe Tyr Gln Gly Gln Trp Ser Thr															
					145				150						160
Val Cys Lys Ala Gly Trp Asn Leu Gln Ala Ser Lys Val Val Cys Arg															
					165				170						175
Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Leu Leu Ala His Arg Cys Cys Asn Lys															
					180				185						190
Asn Thr Gln Gly Lys Gly Pro Ile Trp Met Ser Lys Met Ser Cys Ser															
					195				200						205
Gly Arg Glu Ala Asn Leu Gln Asp Cys Pro Phe Ser Pro Leu Glu Ser															
					210				215						220
Asn Cys Thr His Gly Glu Asp Thr Trp Met Glu Cys Glu Asp Pro Phe															
					225				230						240
Glu Leu Arg Leu Val Gly Gly Asp Thr Thr Cys Ser Gly Arg Leu Glu															
					245				250						255
Val Leu His Lys Gly Ser Trp Gly Ser Val Cys Asp Asp Ser Trp Gly															
					260				265						270
Glu Lys Glu Asp Gln Val Val Cys Lys Gln Leu Gly Cys Gly Lys Ser															
					275				280						285
Leu Phe Pro Ser Pro Lys Ala Arg Gln Ser Phe Gly Pro Gly Thr Gly															
					290				295						300
Arg Ile Trp Leu Asp Asp Val Ser Cys Ser Gly Lys Glu Glu Ser Leu															
					305				310						320
Glu Leu Cys Arg His Arg Leu Trp Gly Tyr His Asp Cys Thr His Lys															
					325				330						335
Glu Asp Val Gly Val Ile Cys Ser Glu Leu															
					340				345						

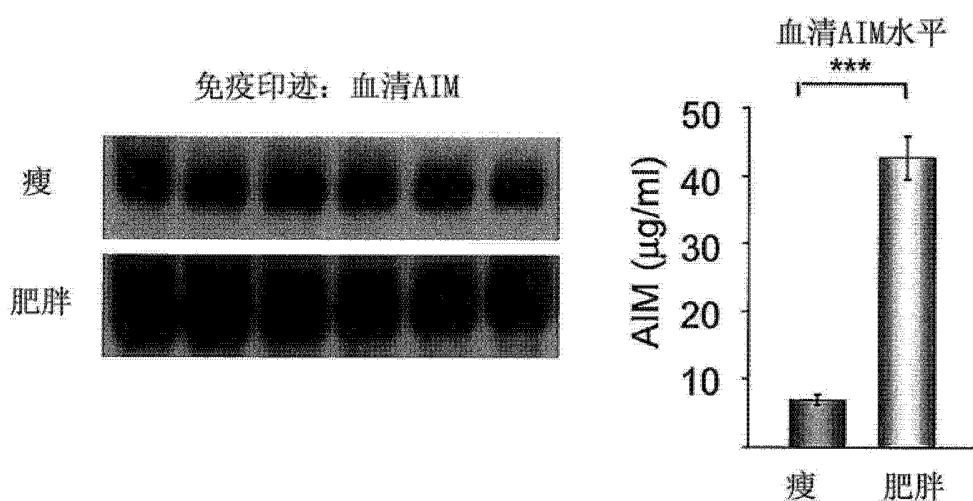


图 1

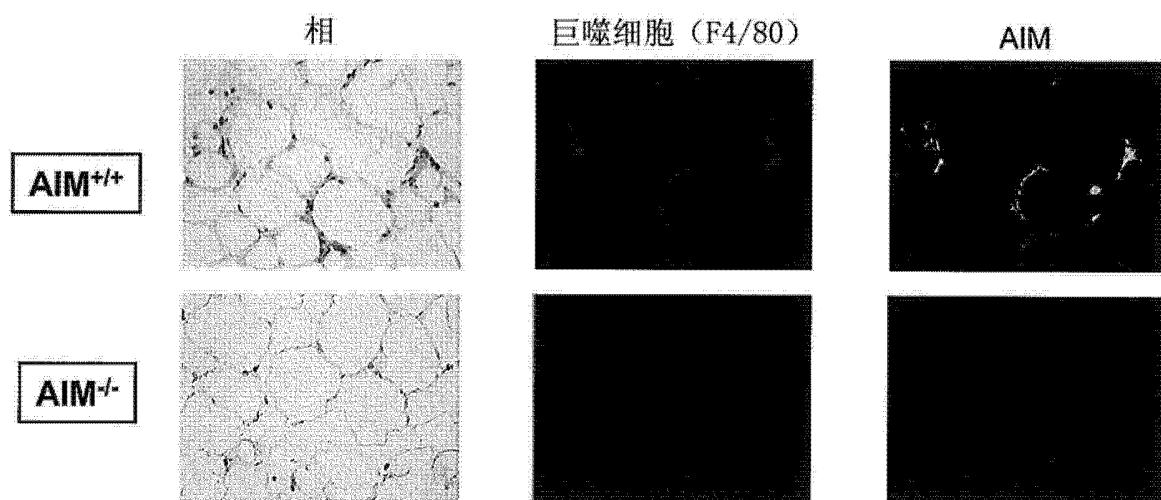


图 2

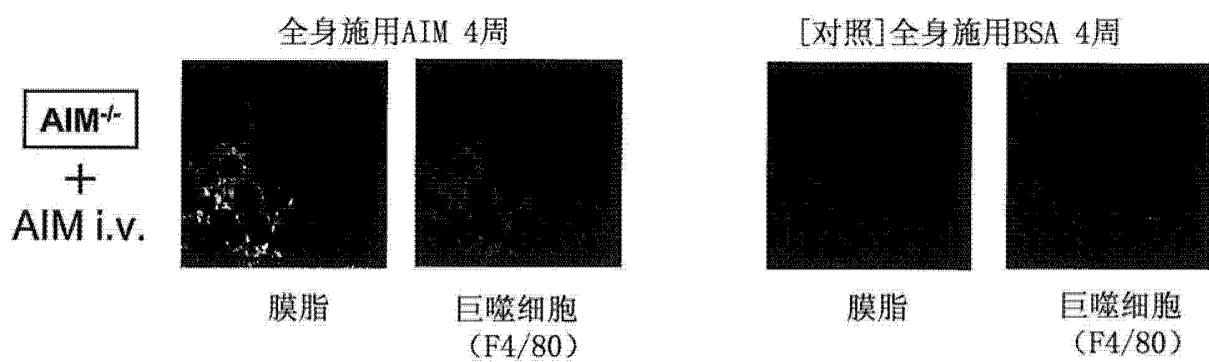


图 3

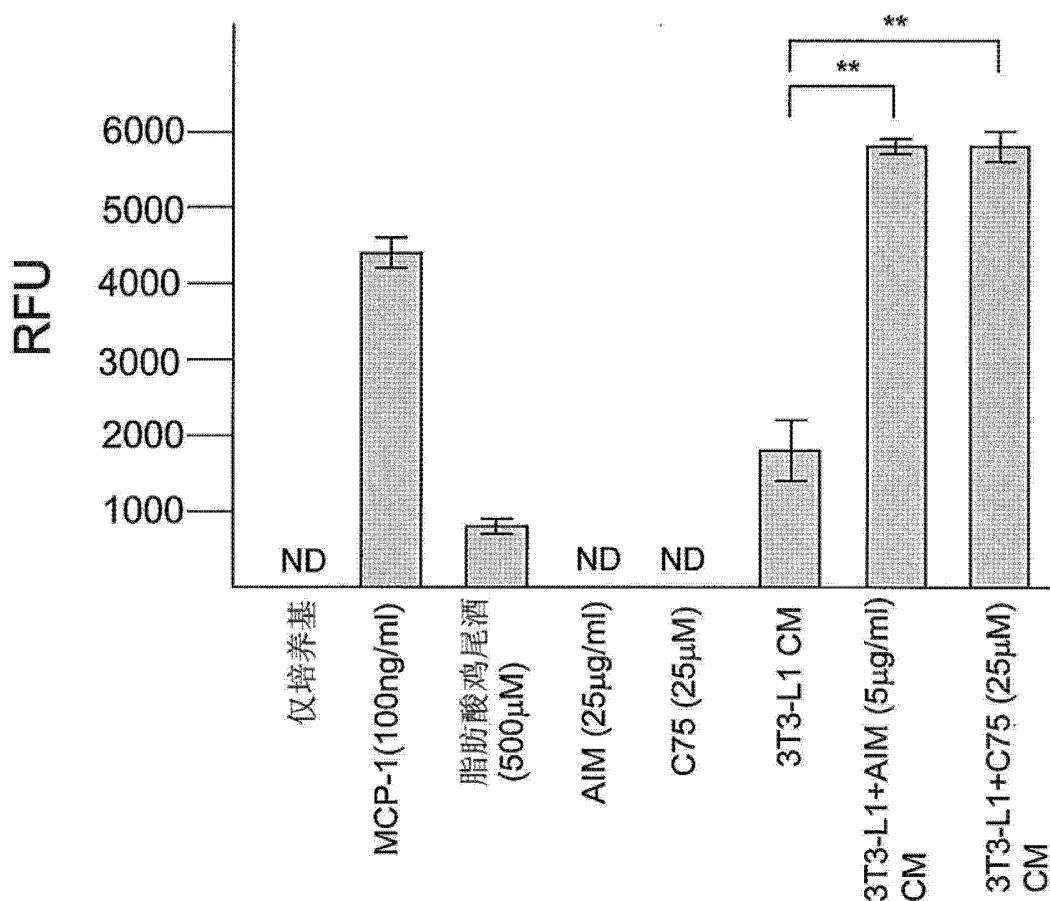


图 4

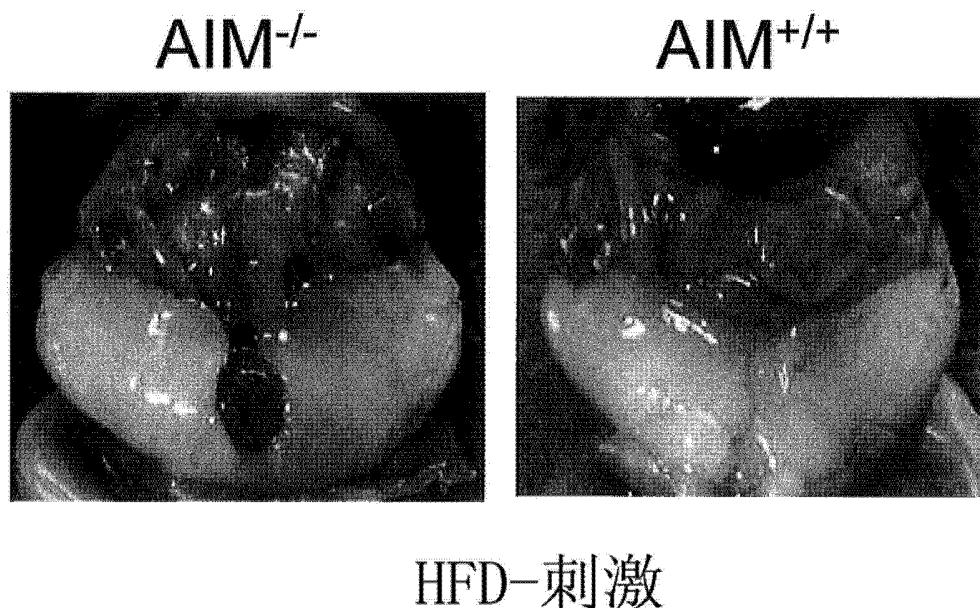


图 5

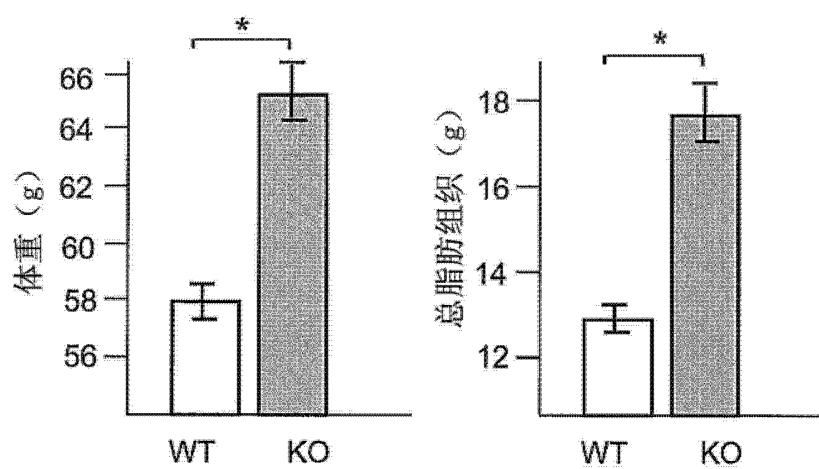


图 6

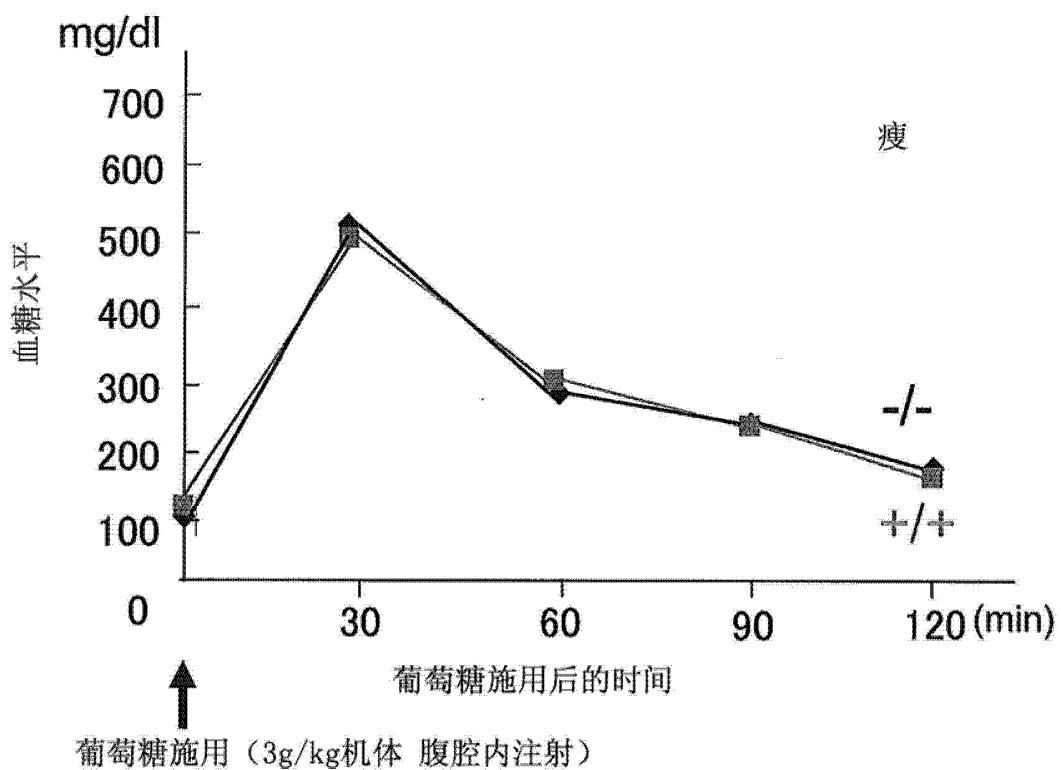


图 7

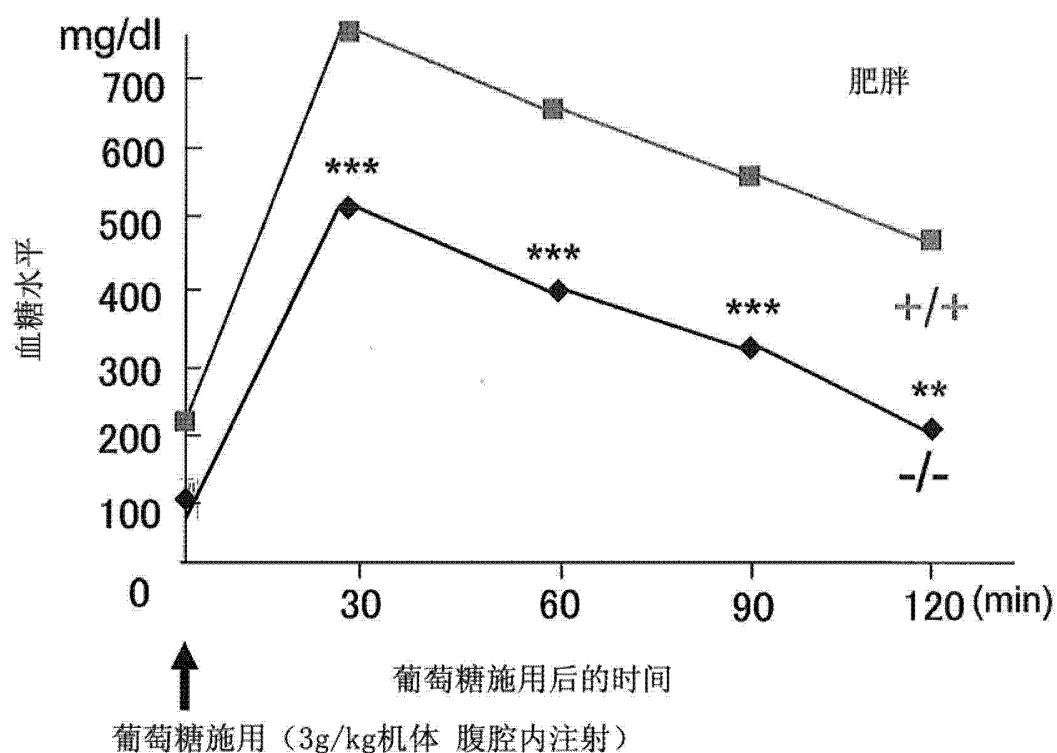


图 8

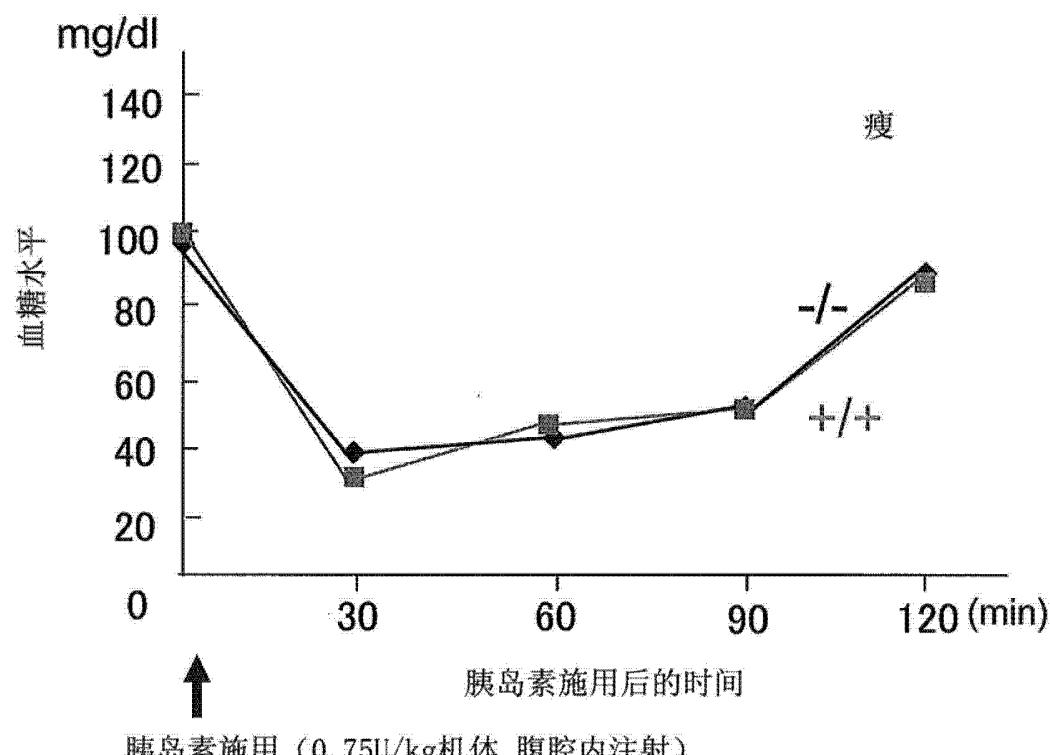


图 9

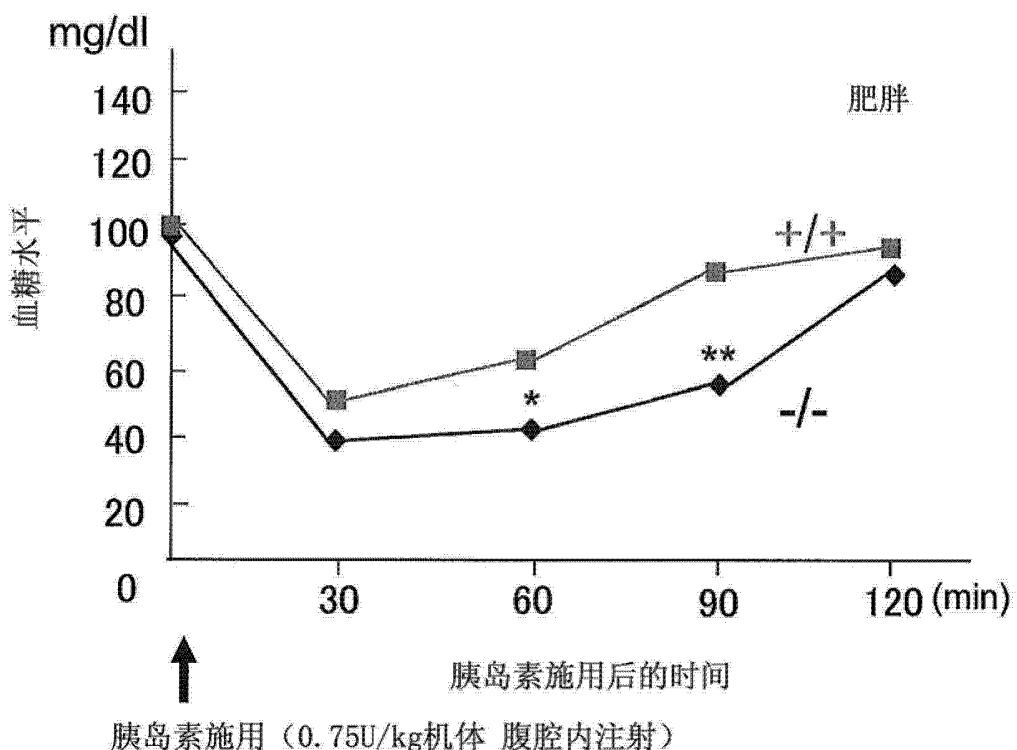


图 10

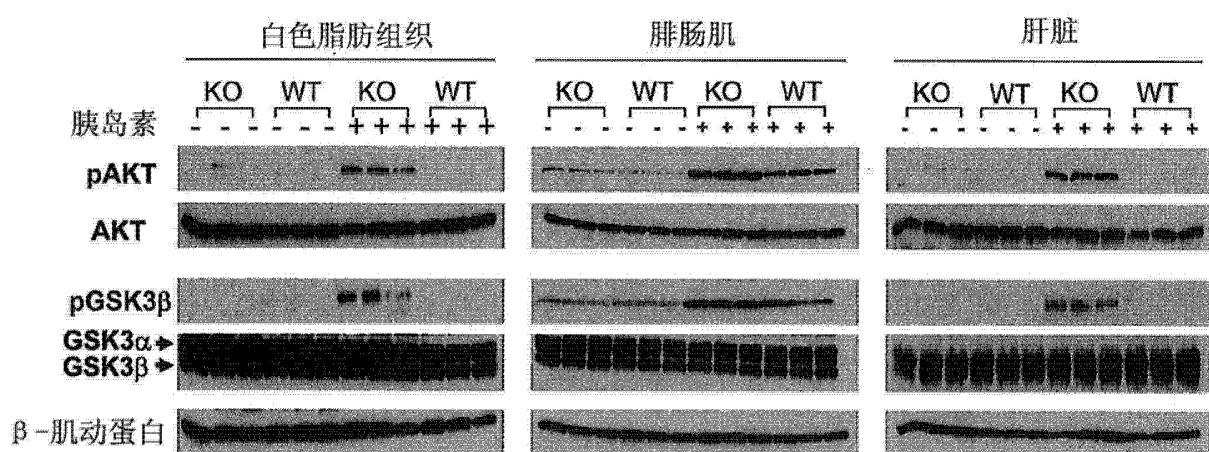


图 11

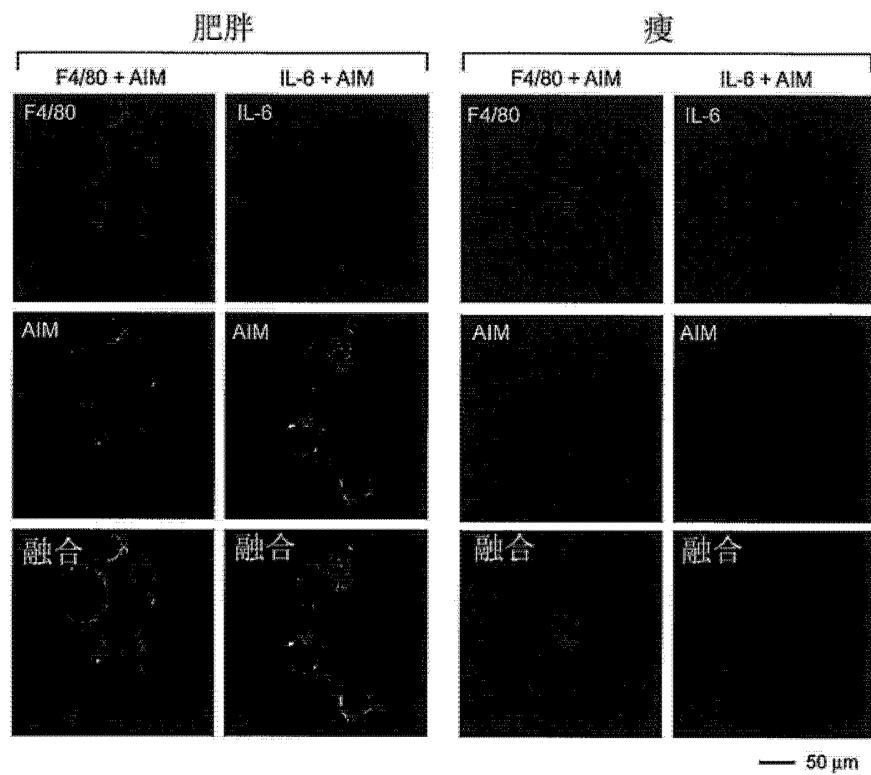


图 12

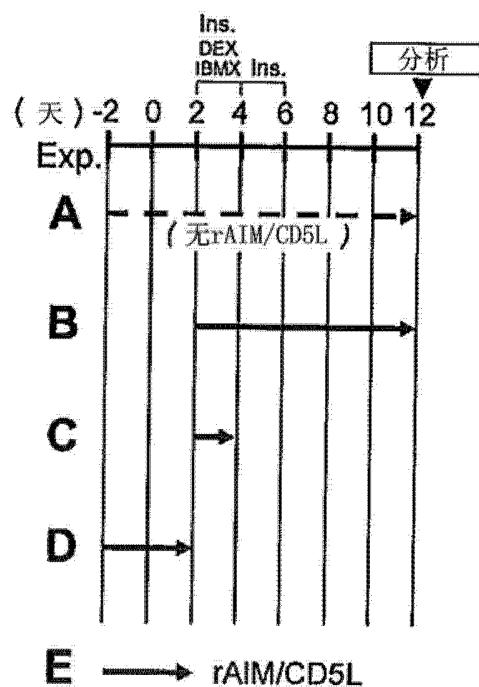


图 13

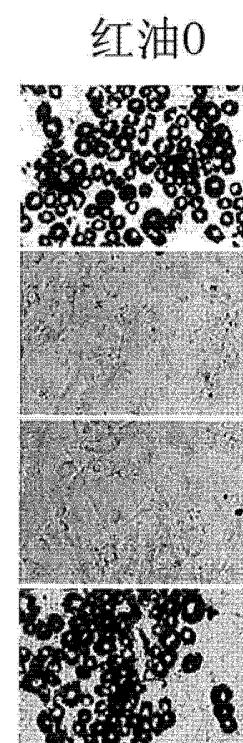


图 14

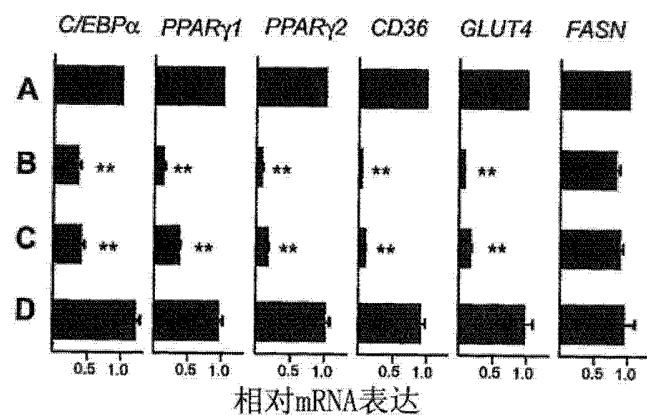


图 15

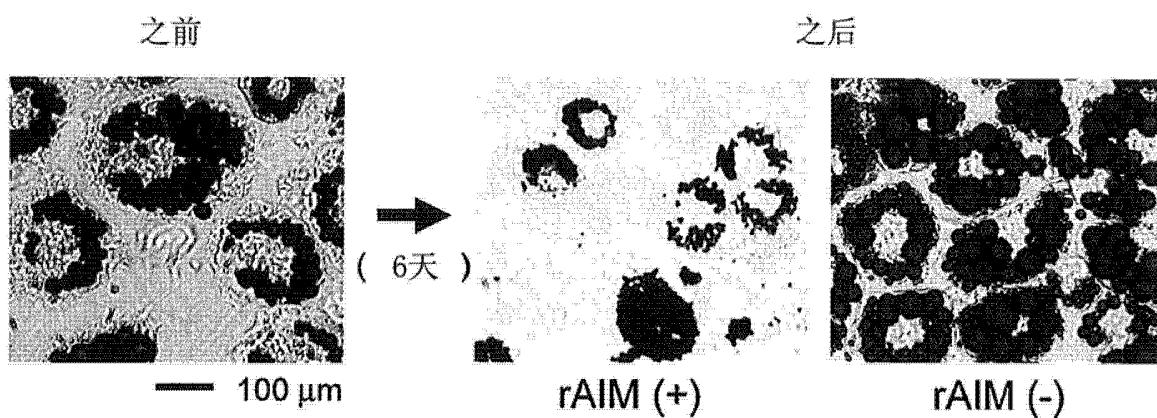


图 16A

相对脂滴尺寸 脂滴 (+) 细胞

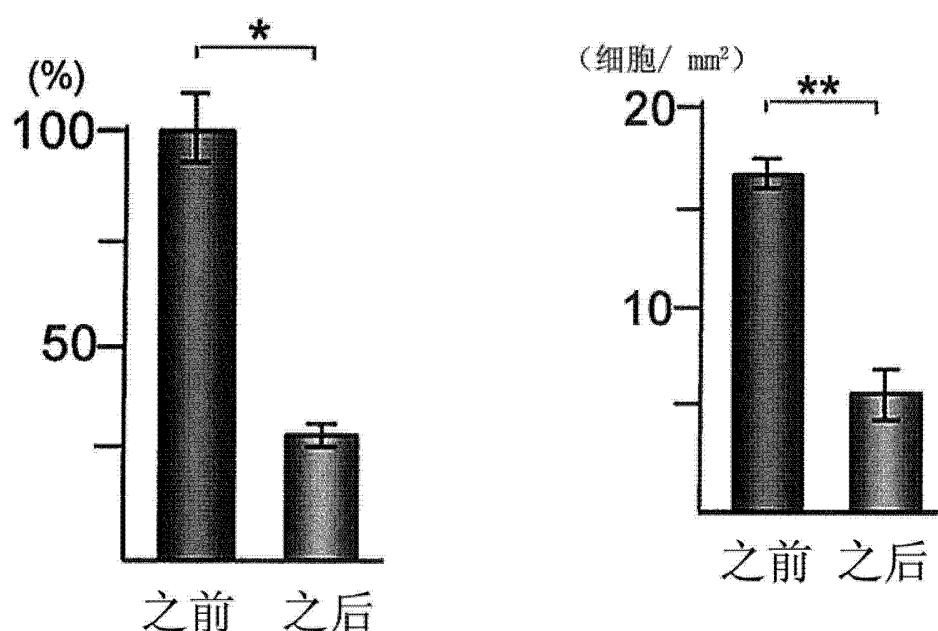


图 16C

图 16B

丙三醇释放

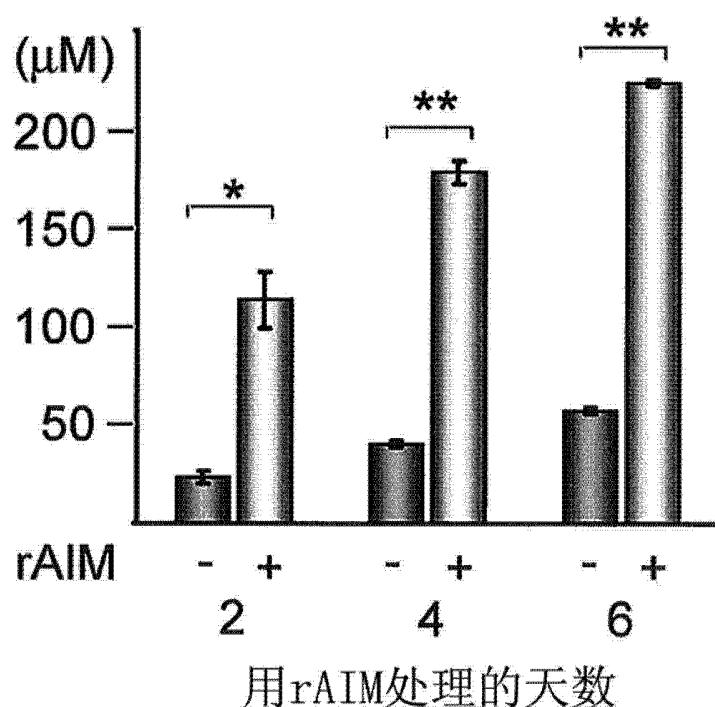


图 17A

FFA释放

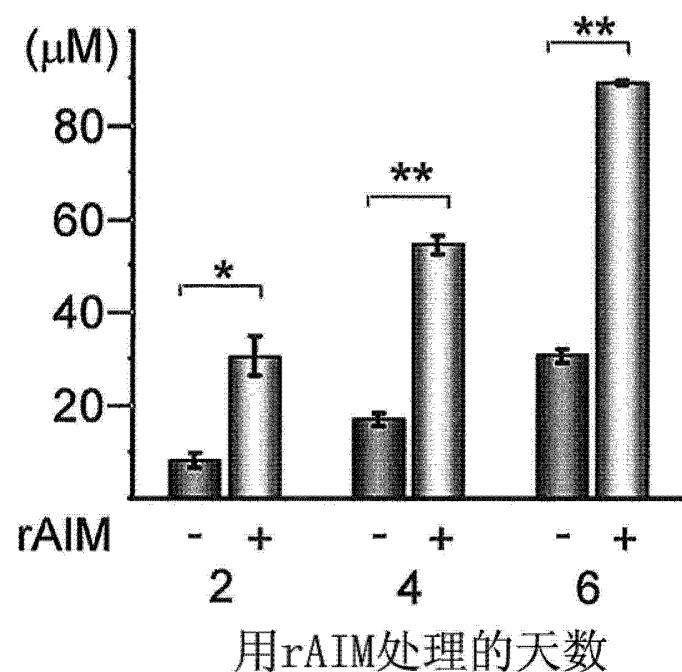


图 17B

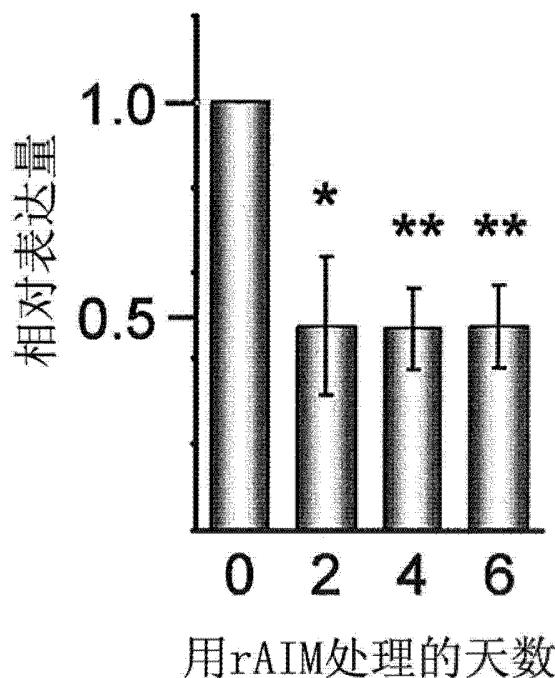
FSP27

图 18A

围脂滴蛋白

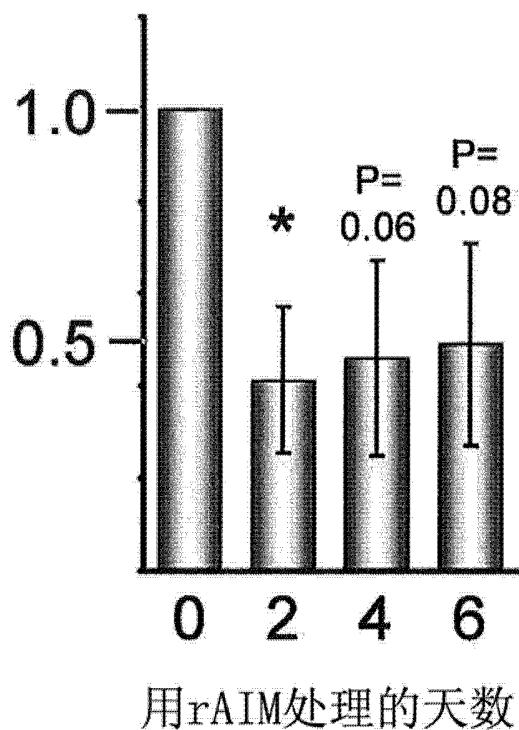


图 18B

脂肪分化相关蛋白

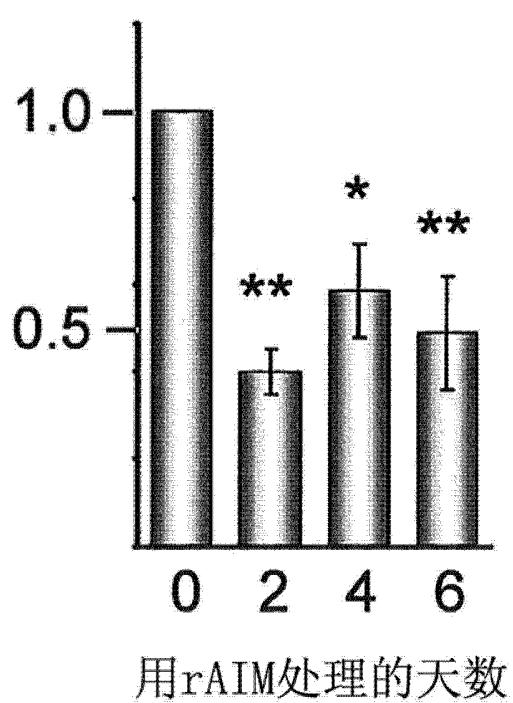


图 18C

脂肪细胞尺寸

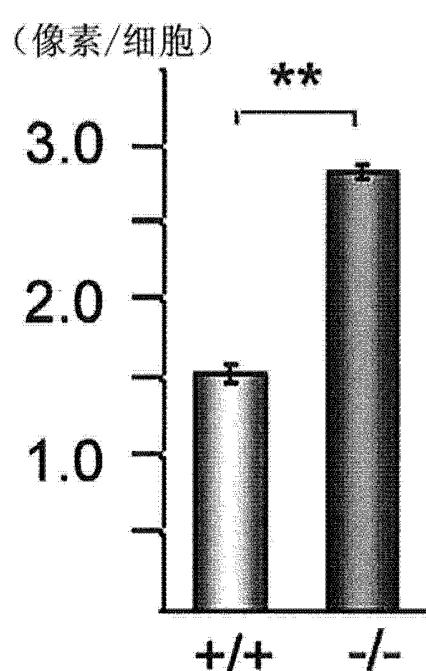
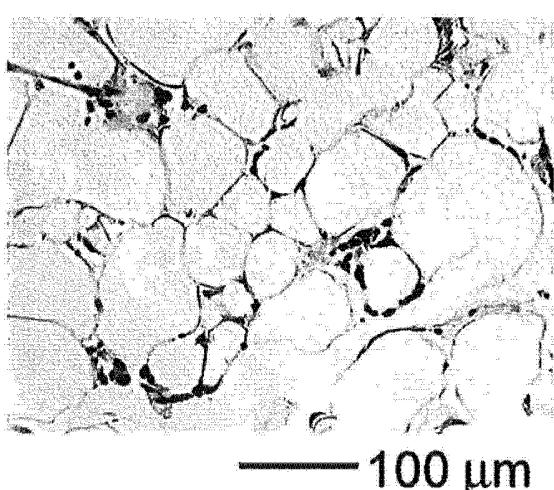
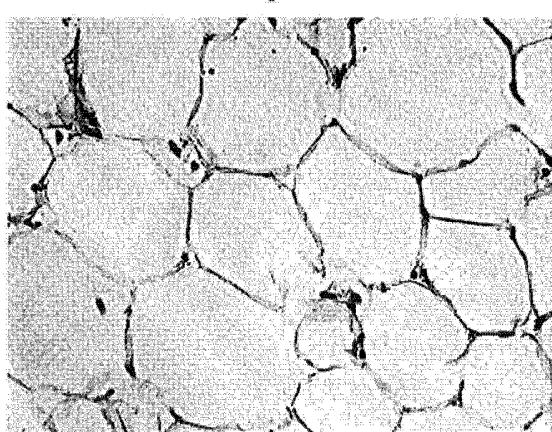


图 19A

+ / +



- / -



— 100 μm

图 19B

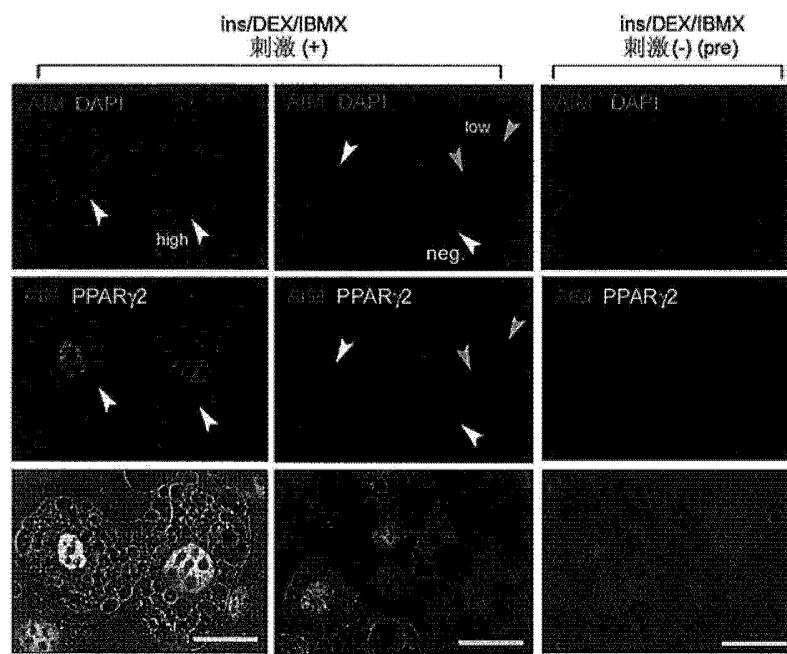
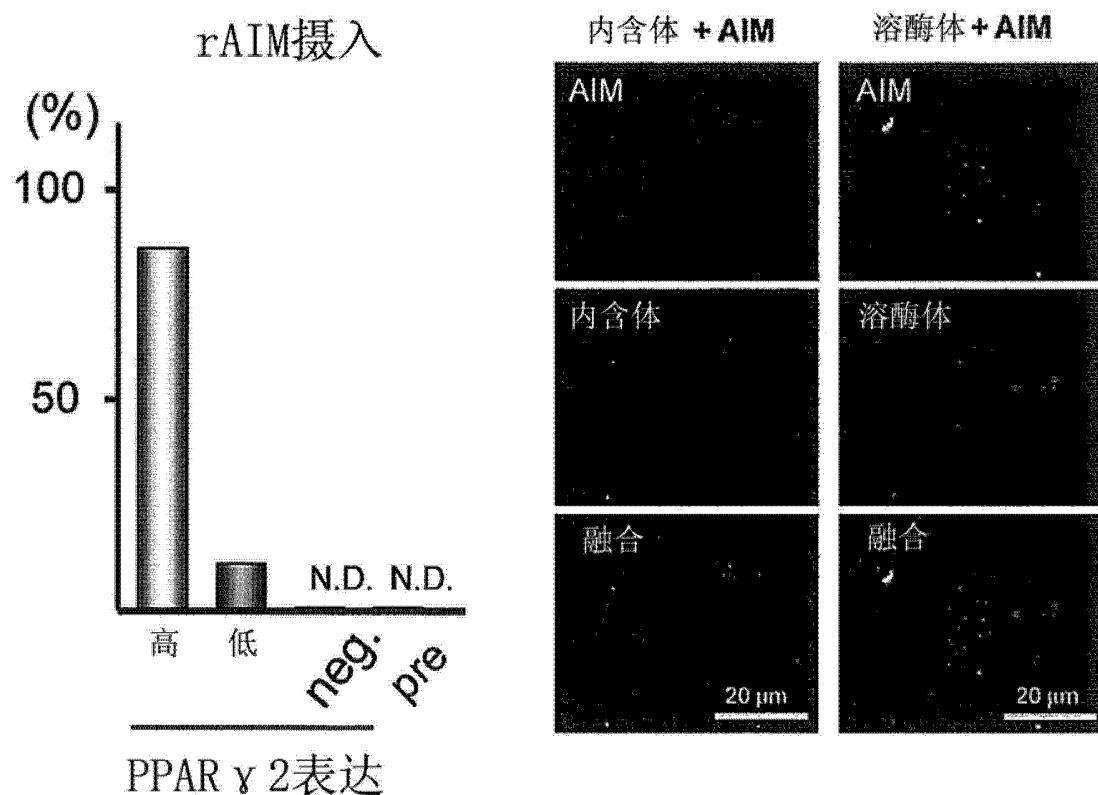


图 20A



PPAR γ 2表达

图 20C

图 20B

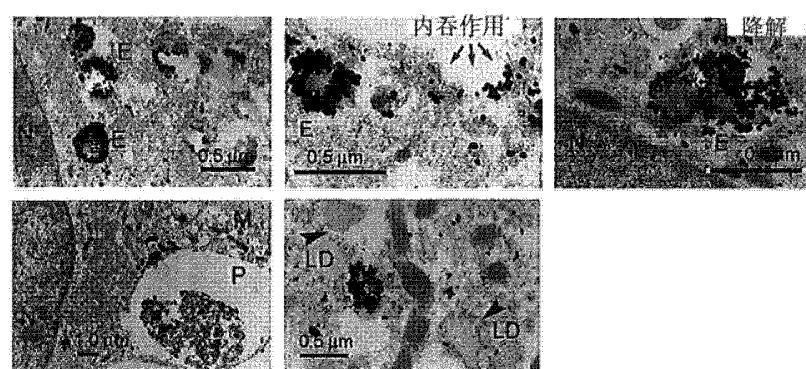


图 21

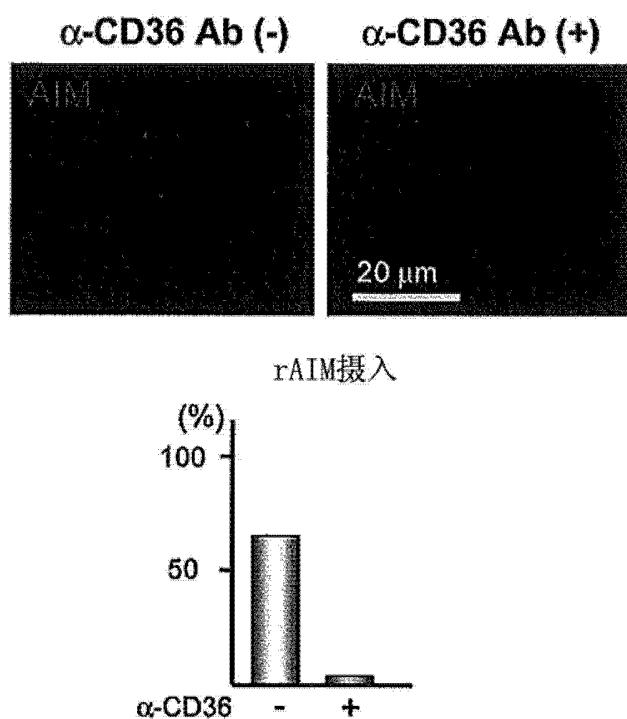


图 22

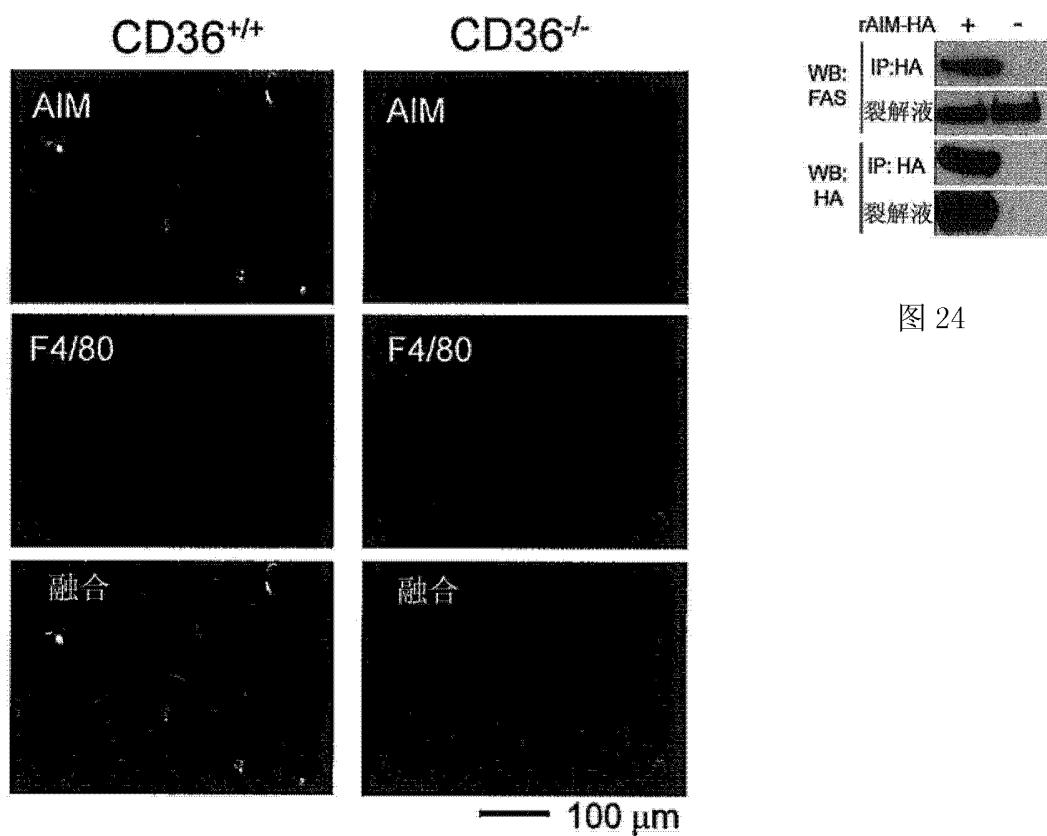


图 23

图 24

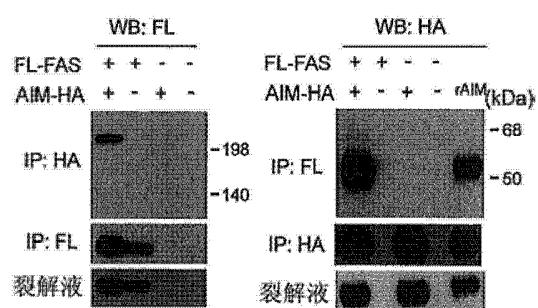
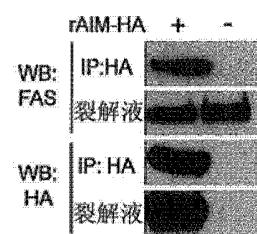


图 25

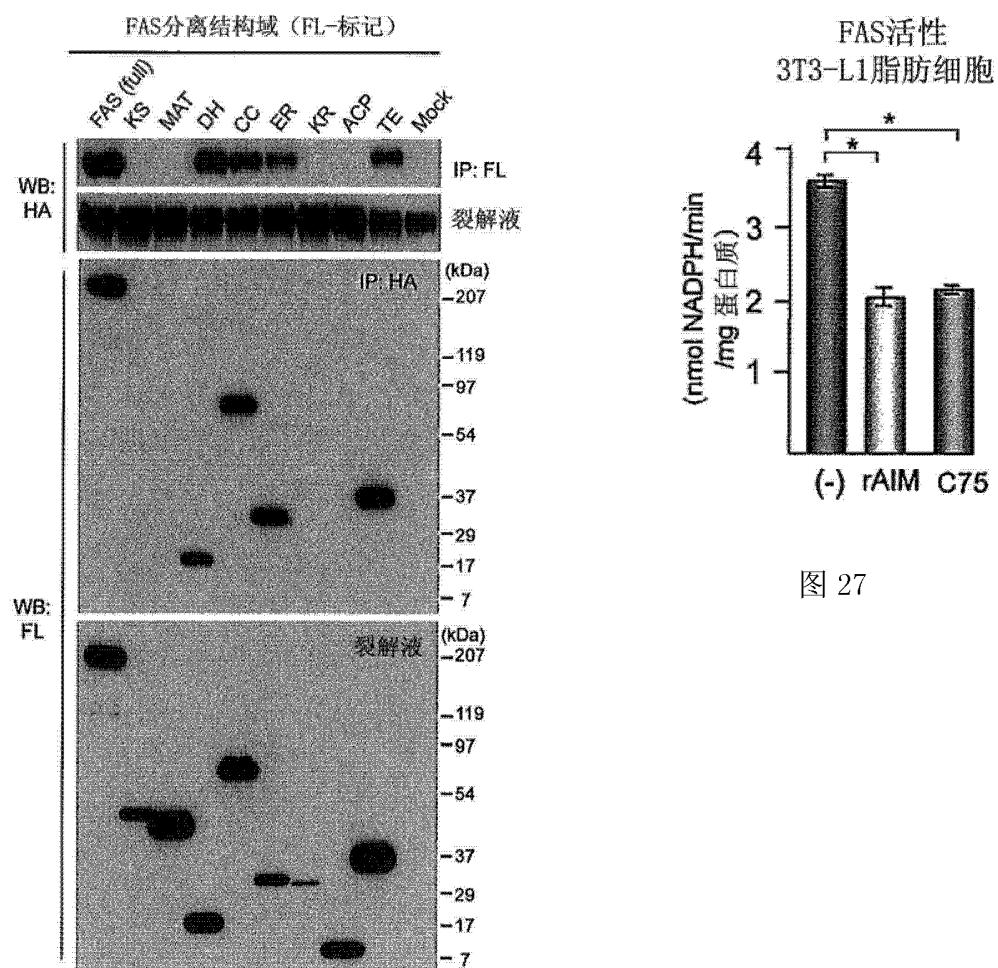


图 27

图 26

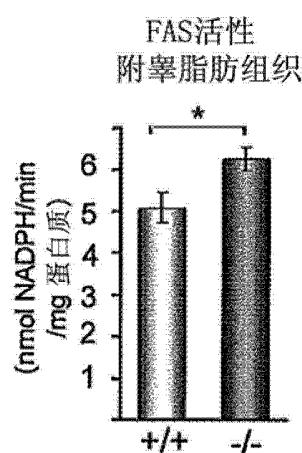


图 28

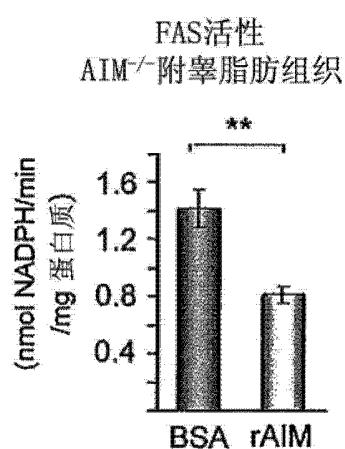


图 29

SRCR1		
1	MALLFSITLA---ICTRPGLASPGVRLVGGLHRCEGRVEVEQKGQWGTVCDDGWDIKD MA LF L LA I F SP V LVGG HREGRVEVE GQWGTVCDDGWD D MAPLFNLMLATLSTFVGSCFSESPTKVQLVGGAHRCGRVEVEHNGQWGTVCDDGWDRRD	60 人类 共有序列 小鼠
61	VAVLCRELCGAASGTPSGILYEPPAEKEQKVLIQSVSCTGTEDTLAQCEQE-EVYDCSH VAV CREL CGA TP G Y PPA EQ VLIQ V C GTEDTLAQCE V DCSH VAVVCRELNCGAVIQTPRGASYQPPAS-EQRVLIQGVDCNGTEDTLAQCELNYDVFDCH	120 人类 共有序列 小鼠
SRCR2		
121	DEDAGASCENPESSFSPVPEGVRLADGPGHCKGRVEVKHQNQWYTVCQTGWSLRAAKVVC EDAGA CENP S PE VRL DGP GHC GRVEV HQ QW TVC GW L KWV EEDAGAQCENPDSOLLFIPEDEVRLVDPGPGHCQGRVEVLHQSQWSTVKAGWNLQVSKVVC	180 人类 共有序列 小鼠
181	RQLGCGRAVLTQKRCNKHAYGRKPIWLSQLSCSGREATLQDCPSGPWGKNTCNHDEDTW RQLGCRA LT CNK G PIW MSCSG EA L C N C H EDTW RQLGCGRALLTYGSCNKSTQGKGPIMMGKMSCSGQEANLRSCLLSRLENN-CTHGEDTWM	240 人类 共有序列 小鼠
SRCR3		
241	ECEDPFDLRLVGGDNLCGRLLEVLLHKGVWGSVCDDNWGEKEQWVCKQLGCGKSLSPSFR ECRDPL L LVGGD CSGRLEVLLHKGSWGSVCDDNWGEKEQWVCKQLGCGKSL PS ECEDPFELKLVGGDTPCSGRLEVLLHKGSWGSVCDDNWGEKEQWVCKQLGCGKSLHPSPK	300 人类 共有序列 小鼠
301	DRKCYGPGVGRIWLDNVRCSCGEESQSLEQCQHRFWGFHDCTHQEDVAVICSG RK YPGC GRIWLD V CSG EQSLE C HR WG HDCTH EDV VIC TRKIYGPGAGRIWLDNVNCSCGKEQSLEFCRHRLWGYHDCTHKEDVEVICTDFDV	351 人类 共有序列 小鼠

图 30

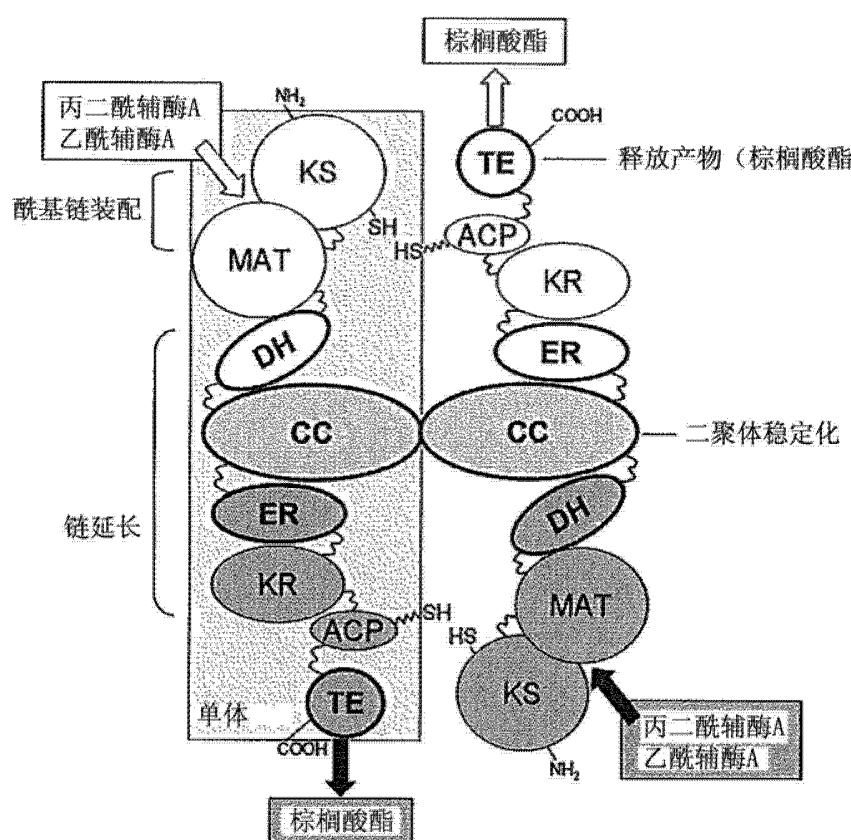


图 31

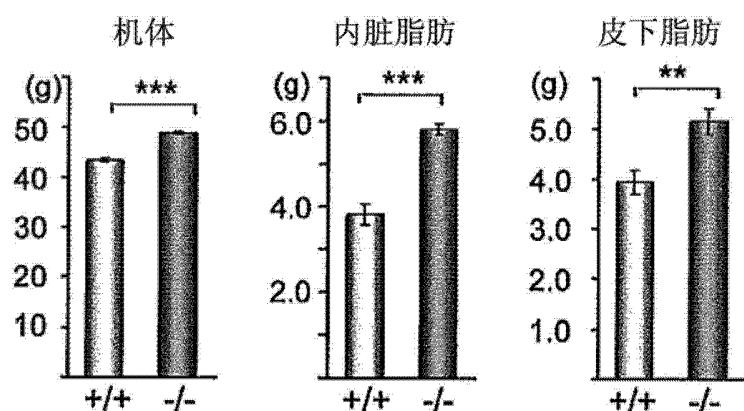


图 32

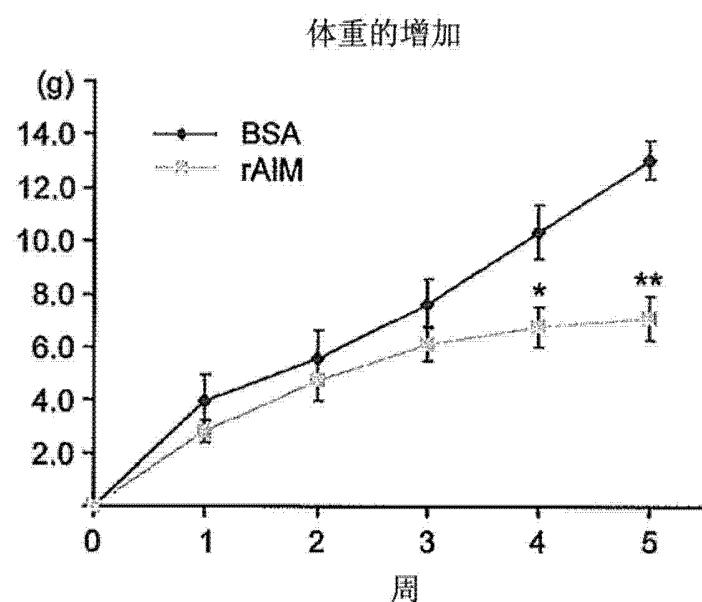


图 33

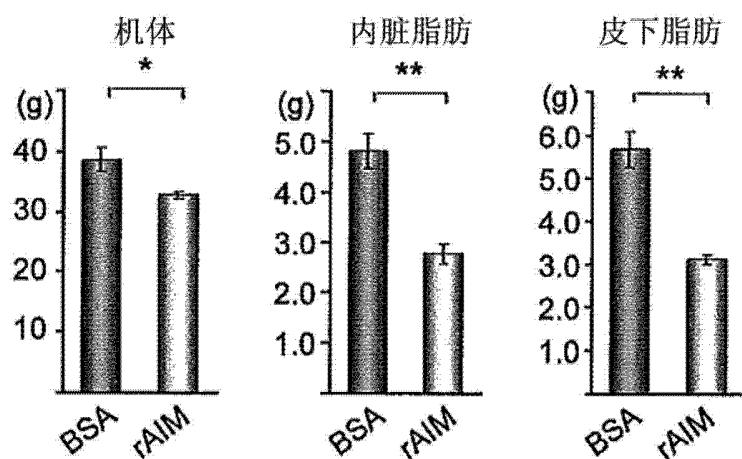


图 34

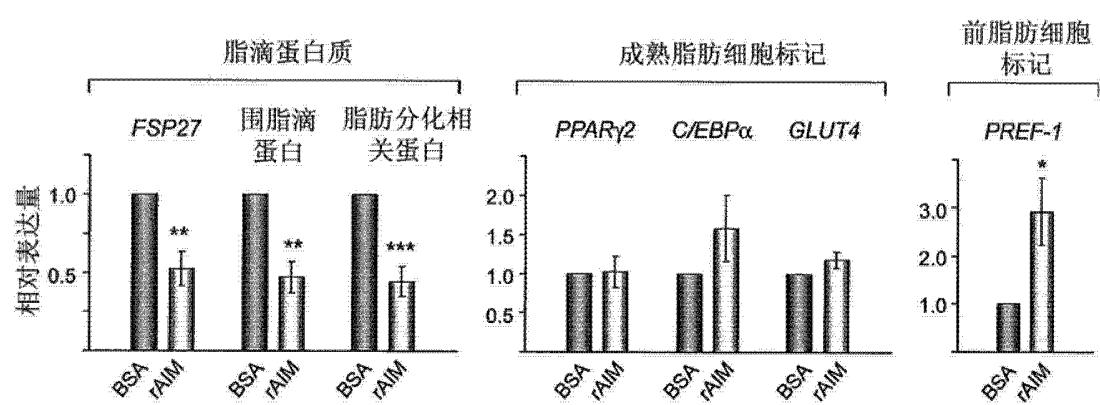


图 35

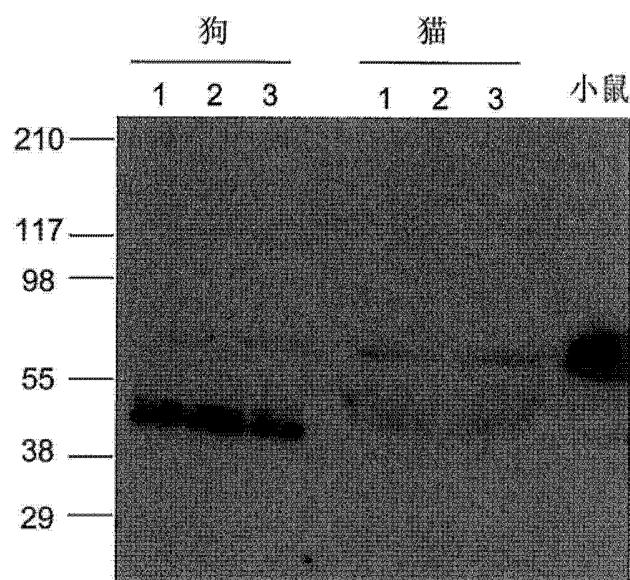


图 36

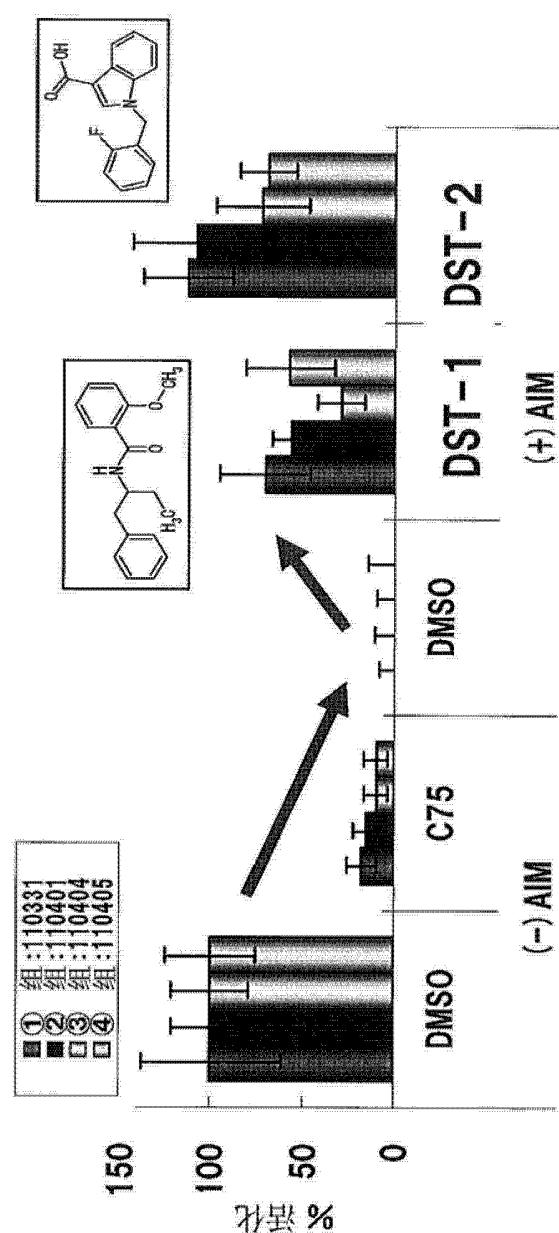


图 37

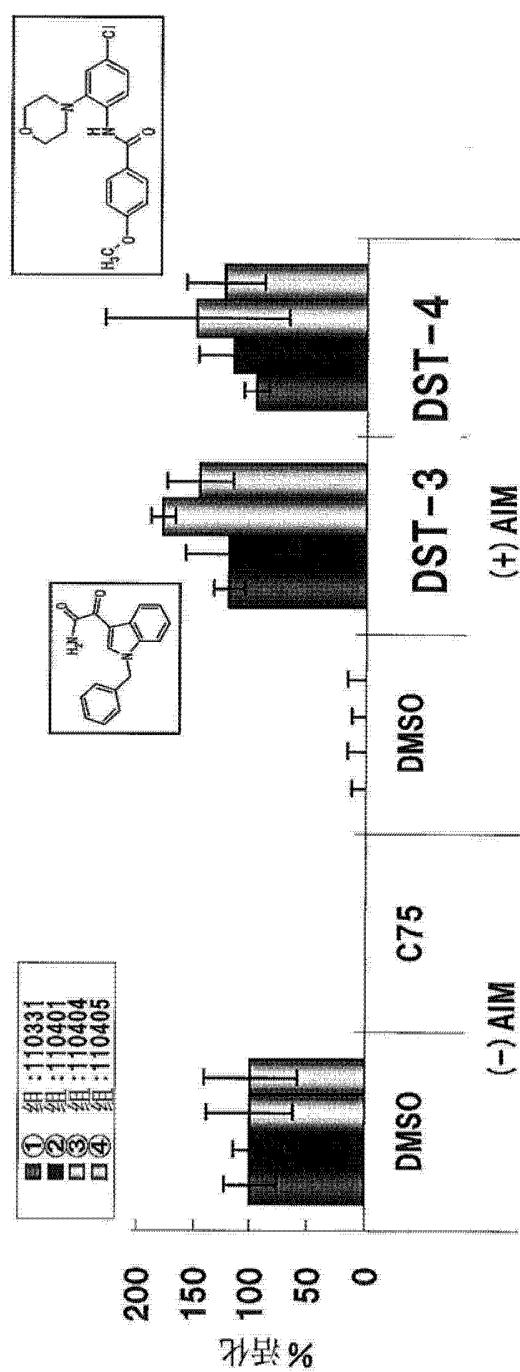


图 38

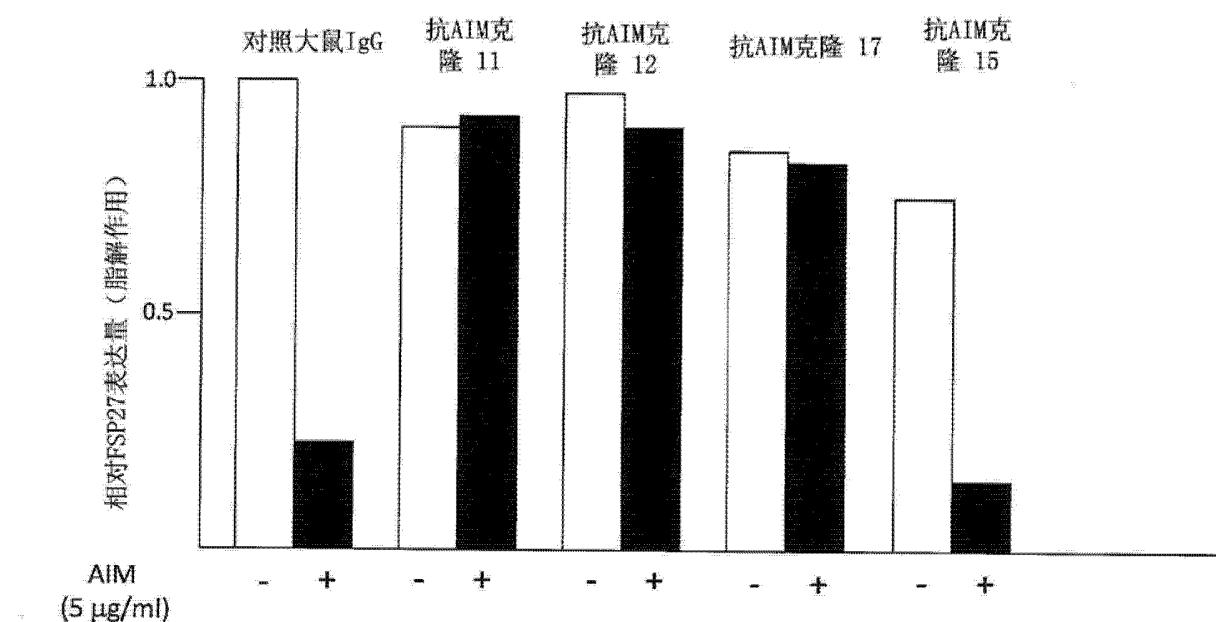


图 39

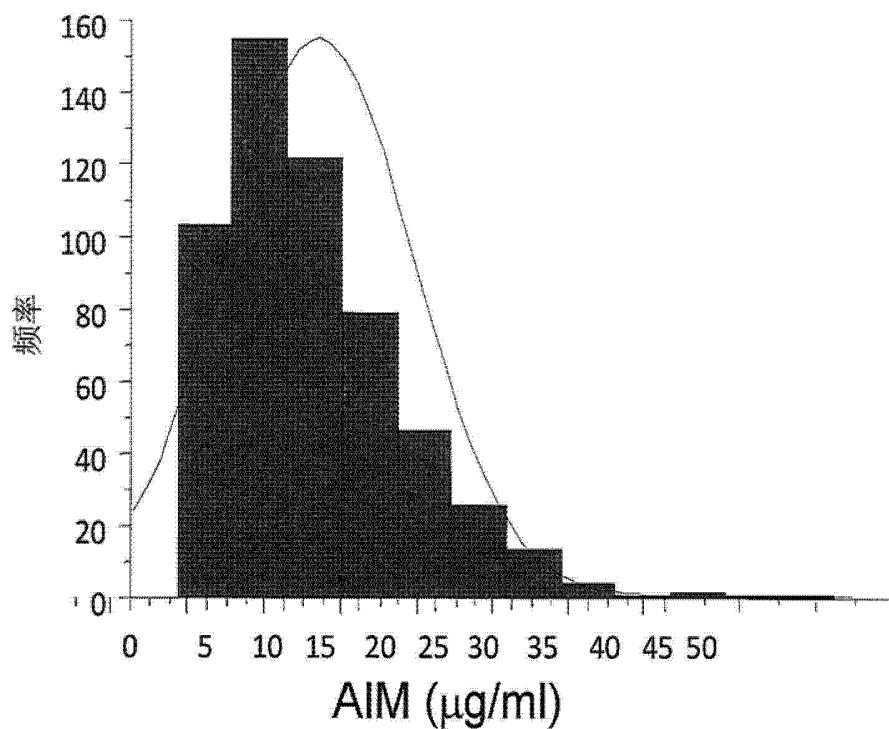


图 40

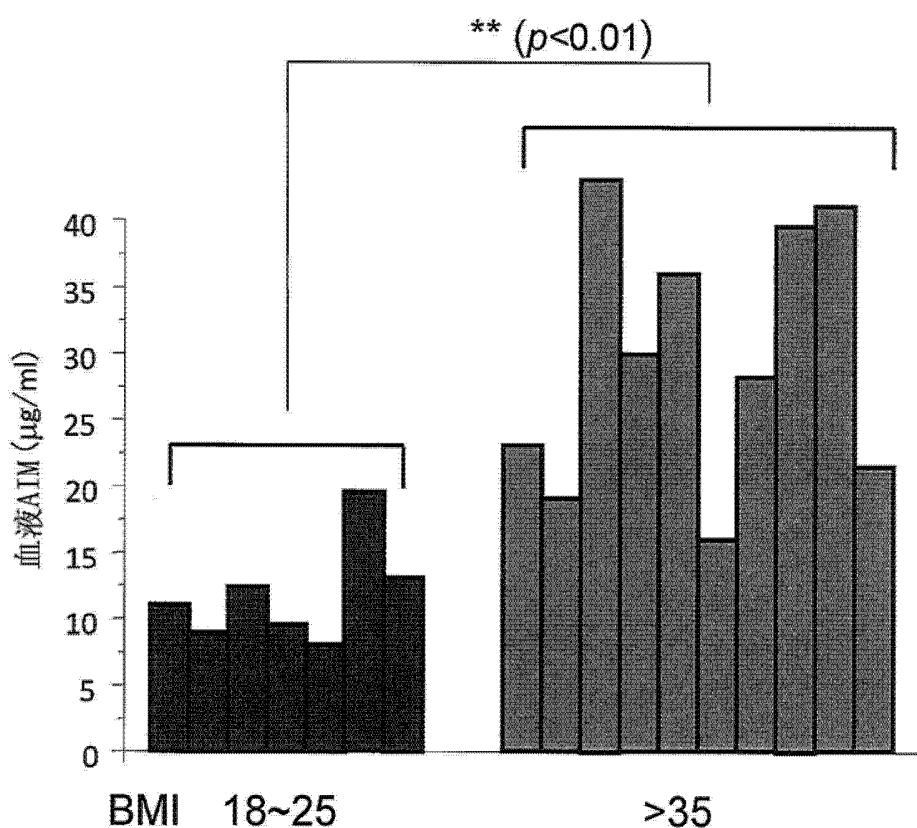


图 41