

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02814450.3

[45] 授权公告日 2008 年 9 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100419425C

[22] 申请日 2002.7.17 [21] 申请号 02814450.3

[30] 优先权

[32] 2001.7.17 [33] JP [31] 216502/01

[86] 国际申请 PCT/JP2002/007277 2002.7.17

[87] 国际公布 WO2003/008967 日 2003.1.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.1.17

[73] 专利权人 帝人株式会社

地址 日本大阪府大阪市

[72] 发明人 山冈一良 高木健一郎 片冈健一郎

山本真则 近西俊洋

[56] 参考文献

US6022897A 2000.2.8

WO9904815A 1999.2.4

Seikagaku jiten (Dai 2 han). KAZUTOMO IMABORI. TOKYO KAGAKU DOJIN. 1995

Up - regulation of uncoupling protein 3 by thyroid hormone, peroxisome proliferator - activate - d receptor ligands and 9 - cisretnoie acidi. Itsuro Nagase et al. FEBS LETTERS, Vol. 461 No. 3. 1999

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 孟凡宏

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 3 页

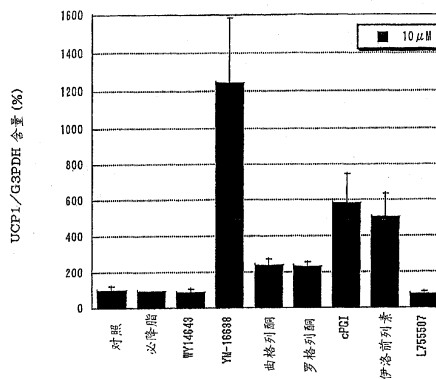
[54] 发明名称

通过测定 PPAR δ 激活作用筛选物质的方法和药剂

[57] 摘要

本发明提供了一种筛选包含具有 PPAR δ 激活作用的化合物的产热促进物质；含有所述化合物的药物；以及具有抗糖尿病、抗肥胖或减少内脏积累脂肪作用的药物。本发明提供一种药剂，其包含具有激活过氧化物酶体增殖物激活的受体 PPAR δ 的作用的化合物，并且具有促进非战栗产热 (nST)，特别是促进在脂肪组织等的细胞中的线粒体解偶联呼吸或线粒体内膜中的质子泄漏，和提高 UCP1 表达量的作用；本发明也提供含有上述化合物的抗糖尿病药剂、抗肥胖药剂和减少内脏积累脂肪的药剂。另外，本发明还提供了通过测定 PPAR δ 激活作用筛选化合物的方法。

UCP1 mRNA 的表达量



1. 筛选具有产热促进作用的物质的方法，其特征在于测定 PPAR δ 激活作用。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的物质具有促进线粒体的解偶联呼吸作用。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的物质具有促进线粒体内膜质子泄漏作用。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的物质能增加 UCP1 在含有线粒体的细胞中的表达量。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的物质能促进脂肪酸 β 氧化作用。
6. 权利要求 1-5 中任一项的筛选物质的方法，该方法利用了报导基因。
7. 权利要求 6 的筛选具有产热促进作用的物质的方法，该方法包括下面(1)-(3)的步骤：
 - (1) 让具有 PPAR δ 激活作用的物质与能表达 UCP1 基因的细胞接触和/或导入所述细胞；
 - (2) 测定 UCP1 基因在所述细胞中的表达量；
 - (3) 筛选能提高所述 UCP1 基因在所述细胞中的表达量的化合物。
8. 权利要求 7 的筛选方法，其中能表达 UCP1 基因的细胞是脂肪细胞或骨骼肌细胞。
9. 权利要求 7 的筛选方法，其中能表达 UCP1 基因的细胞是脂肪细胞。
10. 权利要求 4 的方法所筛选的物质在制备用于减少内脏积累脂肪的药剂或抑制内脏积累脂肪的药剂中的应用。
11. 权利要求 4 的方法所筛选的物质在制备用于预防或治疗肥胖症的药物中的应用。

通过测定 PPAR δ 激活作用筛选物质的方法和药剂

技术领域

本发明涉及一种通过测定激活过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (peroxisome proliferator activated receptor δ , PPAR δ) 的作用来筛选具有产热促进作用的物质的方法, 以及含有具有产热促进作用的化合物的药剂, 该药剂具有 PPAR δ 激活作用。另外, 本发明涉及一种能专一性地增强线粒体功能中的解偶联蛋白 (UCP) 导致的解偶联呼吸或在线粒体内膜中质子泄漏 (以下一般称之为质子泄漏) 的药剂, 线粒体是使用脂肪酸和丙酮酸作为底物的能量代谢 (呼吸) 细胞内的细胞器。另外, 本发明涉及抗糖尿病药剂、抗肥胖药剂、以及减少内脏积累脂肪的药剂或抑制内脏积累脂肪的药剂。

背景技术

体内的能量代谢调节系统, 包括食物摄取调节系统和能量消耗调节系统。能量消耗调节系统参与两种类型的能量消耗, 即用于基础代谢以便维持生命的能量消耗, 和其他能量消耗。在后一种情况下的主要能量消耗是非战栗产热 (nonshivering thermogenesis, nST), 它是产热的, 并且, 它的功能意义是在出生之后即刻、在接触寒冷期间以及在冬眠结束时保持体温等, 以及通过消耗由于吃得过多而产生的多余能量, 从而抑制肥胖和糖脂代谢疾病等。特别是在恒温的哺乳动物和鸟类中, 尤其是小型动物中, nST 对于保持体温来说是重要的。在诱导 nST 的机制中, 线粒体中的质子泄漏, 即细胞呼吸链的电子转运系统和 ATP 合成的参与是重要的。

在褐色脂肪组织 (BAT) 中, 在线粒体膜中存在一种被称为解偶联蛋白 (UCP1) 的特殊蛋白, 其分子量为 32kD, 并且包括大约 300 个氨基酸。该蛋白具有使 ATP 合成与褐色脂肪细胞 (BA) 的呼吸链的电子转运系统解偶联的作用。UCP1 包括一种结构域的三次重复的结构, 该结构域包括大约 100 个氨基酸, 并且每一个结构域具有两个跨膜部

位，一共6个部位。所述跨膜区构成了线粒体膜上的通道。

UCP1是转运质子的载体。由UCP1和其他成分构成的质子通道具有按照电化学梯度使质子自由穿透，以释放热量的功能。这就是nST。就是说，nST通过经质子通道的质子渗透导致所述解偶联，并且，所述解偶联减弱了ATP合成，激活了线粒体内的呼吸，从而保持ATP与ADP的比例恒定。结果，大量脂肪和糖被氧化以产生热量。

UCP1的生理学作用是在出生之后即刻、在接触寒冷期间等情况下保持体温，并且，用转基因小鼠进行的研究，业已证实了它参与肥胖的抑制。在各种肥胖模型中，UCP1表达减弱这一事实，表明了UCP1与肥胖发生、发展和持续的相关性。例如，业已证实，在BAT减少的转基因小鼠中，在没有过量进食的情况下出现了肥胖(Lowell等, *Nature*, 366, 740-742(1993))。另外，在小鼠中观察到了身体脂肪的减少，和对由于高脂肪食物所导致的饮食诱导的肥胖的抗性，其中通过将UCP1基因插入脂肪专一性基因 $\alpha P2$ 的启动子，强制所述小鼠表达大量的UCP1(Kopecky等, *J. Clin Invest*, 96, 2914-2923(1995))。另外，在UCP1表达被抑制到1/3的小鼠体内，观察到了在暴露于寒冷的环境时体温保持功能的减弱、由于身体脂肪的增加而导致的肥胖和胰岛素抗性(Lowell B.B.等, *Nature*, 366, 740-742(1993))。另外，UCP1剔除小鼠是不耐寒的(Enerback S.等, *Nature*, 387, 90-94(1997))。如上文所述，通过动物实验业已了解到UCP1作为产热分子在体温调节和能量消耗方面具有重要作用，并且与肥胖密切相关。

UCP1表达的数量，主要是由核内基因转录水平调控的，而UCP1基因表达随cAMP浓度的提高而加强(斋藤等, *最新医学*, 52, 1095-1096(1997))。

大约20-40%的细胞内能量消耗被认为是通过线粒体内膜上的质子泄漏而产生的。另外，在具有很少BAT的成年人和其他动物中，大部分nST被认为是在骨骼肌和白色脂肪组织(WAT)中产生的。基于上述事实，一直认为UCP存在于除了BAT以外的组织中。有两个研究小组在1997年连续报导了来自除了BAT以外的组织的UCP2的cDNA克隆(Fleury等, *Nature Genet*, 15, 269-272(1997); Gimeno等, *Diabetes* 46, 900-906(1997))。

人 UCP2 表现出与人 UCP1 的 59% 的同源性, 并且像 UCP1 那样形成了具有 6 个跨膜区的通道, 并且它具有嘌呤核苷酸结合位点。UCP2 与 UCP1 的不同之处在于, 它是在系统组织中广泛表达的, 在肺和胰腺中是以特别高的浓度表达的, 并且在心脏、肝脏、大脑、肾脏、睾丸、WAT、BAT 和骨骼肌中也检测到了表达。

至于 UCP2 功能, 在食用高脂肪饮食的小鼠体内, 观察到在附睾周围的脂肪组织中 UCP2 基因表达的上调。不过, 据报导, UCP2 剔除小鼠在寒冷条件下, 在体温保持功能方面是正常的 (Arsenijevic D. 等, *Nature Genet*, 26, 387-388 (2000))。另外, 在上述 UCP1 剔除小鼠中观察到了褐色脂肪组织中 UCP2 的表达得到充分上调, 这种现象被认为是代偿作用, 并且所述小鼠不耐寒 (Enerback, F. 等, *Nature*, 387, 90-94 (1997))。另外, 业已证实 UCP2 能通过改变胰腺 β 细胞中细胞内 ATP 浓度, 抑制胰岛素分泌 (Zhang C.-Y. 等, *Cell*, 105, 745-755 (2001))。对于糖尿病治疗来说, 这是一种不利的特征。如上文所述, 对于 UCP2 来说, 到目前为止, 与能量消耗/肥胖的关系尚未搞清楚, 尽管业已证实了其质子通道的解耦联功能。

体内的多余能量, 最初主要是作为内脏脂肪积累的 (特别是作为肠系膜脂肪)。与其他部位的脂肪 (特别是皮下脂肪) 相比, 内脏脂肪容易受到脂肪动员 (adipokinetic) 作用, 快速地分解和消耗。内脏脂肪 (肥胖) 被认为是导致与生活方式相关的疾病 (成年人疾病) 的多重危险因素。其原因是从 WAT 中的白色脂肪细胞 (WA) 中分泌的脂肪酸通过门静脉直接流入肝脏, 促进了胰岛素耐受性和脂肪合成, 其结果是, 诱导了糖耐受性异常、高血压和高血脂, 并且, 这些疾病最终并发导致动脉硬化。因此, 预计抑制内脏脂肪的积累和减少内脏脂肪的积累, 能有效预防与生活方式相关的疾病 (如成年人的糖尿病) 的发生, 并且治疗所述疾病。

过氧化物酶体增殖物激活的受体 (PPAR) 在它的结构等方面被认为是核受体 (核激素受体) 超家族的一员。到目前为止, 业已鉴定了三种类型的 PPAR 亚型, 这三种亚型是 PPAR α , PPAR δ (又称为 NUC-1、PPAR β 或 FAAR) 和 PPAR γ , 并且业已克隆了它们的基因 (cDNA) (Lemberger 等, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 12, 335-363

(1996)) .

据报导, 贝特 (fibrate) 药剂对三种类型 PPAR 中的 PPAR α 具有配体作用, 在临床上表现出对血清甘油三酯含量的很强的降低作用 (Forman 等, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 94, 4312-4317 (1997)) .

PPAR γ 主要是在脂肪组织中表达的, 并且据报导, PPAR γ 是与调控脂肪细胞分化密切相关的因子 (Tontonoz 等, Genes and Development, 8, 1224-1234(1994); 和 Tontonoz 等, Cell, 79, 1147-1156 (1994)) . 各种类型的噻唑烷二酮衍生物, 在非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM) 的动物模型中表现出降血糖作用, 并且预期可以作为 NIDDM 的新型治疗剂, 它具有胰岛素抗性解除作用. 最近的研究证实了噻唑烷二酮衍生物还具有作为 PPAR γ 的配体的作用, 并且能专一性地激活 PPAR γ (Lehman 等, J. Biol. Chem., 270, 12953-12956(1995)) .

不过, 尚未搞清楚 PPAR δ 的生理学功能 (Willson 等, J. Med. Chem, 43 (4), 527-550 (2000)) . WO97/28149 披露了一种具有血液 HDL 提高作用的 PPAR δ 配体, 而 WO99/04815 披露了施用 PPAR δ 受体激活物质能够降低胆甾醇含量. 不过, 没有说明或暗示 PPAR δ 和产热促进作用与 PPAR δ 和解偶联蛋白之间的相关性.

另外, 已知诸如花生四烯酸、卡巴前列环素 (carbaprostacyclin, cPGI)、L-165041 (4-(3-(2-丙基-3-羟基-4-乙酰-苯氧基)丙氧基)-苯氧基乙酸) 的不饱和脂肪酸, 能增强 UCP2 的表达 (The Journal of Biological Chemistry, Vol 276, No.14, Issue of April 6, pp.10853-10860, 2001) . 不过, 没有有关 UCP1 和 PPAR δ 之间的相关性的报导.

发明内容

本发明的目的是提供一种筛选具有产热促进作用的物质的方法, 以及含有所述物质作为有效成分的药剂. 本发明的进一步的目的是提供一种抗糖尿病药剂, 抗肥胖药剂和用于减少内脏脂肪积累或抑制内脏脂肪积累的药剂.

本发明的发明人关注的是由 nST 对体内能量消耗调节系统的刺激而产生的产热促进作用. 他们试图促进线粒体的解偶联呼吸, 促进 BAT 线粒体中的质子泄漏 (相对 nST 组织而言是比较小的), 促进 WAT 线

粒体中的质子泄漏，并且促进 UCP1（解偶联蛋白的同系物）的功能，由此提高它们的效率。

本发明的发明人为了解决上述问题进行了深入的研究，发现卡巴前列环素（cPGI：6,9 α -亚甲基-11 α ,15S-二羟基-prosta-5E,13E-二烯-1-酸）和伊洛前列素（Iloprost，5-{(E)-(1S,5S,6R,7R)-7-羟基-6-[(E)-(3S,4RS)-3-羟基-4-甲基-5-辛-6-烯]-双环[3.3.0]-3-亚辛基}戊酸）（它们是非专一性 PPAR 配体），在骨骼肌细胞或脂肪细胞中具有 UCP1 表达促进作用。

这一新的发现与以下发现组合在一起：贝特化合物和 Wy14643（它们是 PPAR α 的配体），以及噻唑烷二酮化合物（它们是 PPAR γ 的配体），几乎不表现 UCP1 表达促进作用。根据这一组合发现，本发明人推测 PPAR δ 主要参与 UCP1 表达促进作用，并且他们还还对具有 PPAR δ 激活作用的化合物做了进一步的研究。

结果，通过使用人类或啮齿类动物的骨骼肌细胞或脂肪细胞进行的实验，他们发现具有 PPAR δ 激活作用的物质表现出 UCP1 表达促进作用。

另外，基于 UCP 基因的表达是由 PPAR δ 调控这一事实，本发明的发明人证实了可以通过测定 PPAR δ 激活作用，筛选具有产热促进作用的物质，它能增强 UCP1 基因的表达并且促进 nST 功能。

因此，本发明包括以下主题：

(1) 筛选具有产热促进作用的物质的方法，其特征在于测定 PPAR δ 激活作用。

(2) 筛选具有促进线粒体的解偶联呼吸作用的物质的方法，其特征在于测定 PPAR δ 激活作用。

(3) 筛选具有促进线粒体内膜质子泄漏作用的物质的方法，其特征在于测定 PPAR δ 激活作用。

(4) 筛选能增加 UCP1 在含有线粒体的细胞中的表达量的物质的方法，其特征在于测定 PPAR δ 激活作用。

(5) 筛选能促进脂肪酸 β 氧化作用的物质的方法，其特征在于测定 PPAR δ 激活作用。

(6) 如上述 (1) - (5) 中任一项的筛选物质的方法，该方法利

用了报导基因。

(7) 如第(6)项中的筛选具有产热促进作用的物质的方法, 该方法包括下面①-③的步骤:

①让具有 PPAR δ 激活作用的物质与能表达 UCP1 基因的细胞接触和/或导入所述细胞,

②测定 UCP1 基因在所述细胞中的表达量, 和

③筛选能提高所述 UCP1 基因在所述细胞中的表达量的化合物。

(8) 如第(7)项中的筛选方法, 其中能表达 UCP1 基因的细胞是脂肪细胞或骨骼肌细胞。

(9) 如第(7)项中的筛选方法, 其中能表达 UCP1 基因的细胞是脂肪细胞。

(10) 具有产热促进作用的药剂, 其含有具有 PPAR δ 激活作用的物质作为有效成分。

(11) 促进线粒体的解偶联呼吸的药剂, 其含有具有 PPAR δ 激活作用的物质作为有效成分。

(12) 促进线粒体内膜中的质子泄漏的药剂, 其含有具有 PPAR δ 激活作用的物质作为有效成分。

(13) 提高 UCP1 在含有线粒体的细胞中的表达量的药剂, 其含有具有 PPAR δ 激活作用的物质作为有效成分。

(14) 促进脂肪酸 β 氧化的药剂, 其含有具有 PPAR δ 激活作用的物质作为有效成分。

(15) 如上述(10)-(14)中任一项的药剂, 其中具有 PPAR δ 激活作用的物质是非专一性 PPAR 配体或 PPAR δ 配体。

(16) 如上述(10)-(14)中任一项的药剂, 其中具有 PPAR δ 激活作用的物质是卡巴前列环素、伊洛前列素或 p-(3-(4-乙酰基-3-羟基-2-丙基苯氧基)-丙氧基)苯乙酸。

(17) 如(11)-(13)中任一项的药剂, 其中线粒体存在于骨骼肌、白色脂肪组织或褐色脂肪组织的细胞中。

(18) 如(11)-(13)中任一项的药剂, 其中线粒体存在于白色脂肪组织或褐色脂肪组织的细胞中。

(19) 抗糖尿病药剂、抗肥胖药剂、减少内脏积累脂肪的药剂或

抑制内脏积累脂肪的药剂，其含有具有 PPAR δ 激活作用的物质作为有效成分。

(20) 抗糖尿病药剂、抗肥胖药剂、减少内脏积累脂肪的药剂或抑制内脏积累脂肪的药剂，其含有如 (10) - (18) 中任一项的药剂作为有效成分。

附图简述

图 1 表示通过 PPAR δ 配体之外的各种类型的测试化合物在人类脂肪细胞中诱导的 UCP1 mRNA 表达量。

图 2 表示通过 PPAR δ 配体或各种类型的测试化合物在人类脂肪细胞中诱导的 UCP2 mRNA 表达量。

图 3 表示通过 PPAR δ 配体或各种类型的测试化合物在人类脂肪细胞中导致的游离脂肪酸 β 氧化作用的促进程度。

实施本发明的方式

本发明的具有能专一性地增强 nST 组织的线粒体中质子泄漏等作用的药剂，包括具有 PPAR δ 激活作用的化合物或其衍生物作为有效成分。本发明的所述药剂可以是上述有效成分本身或者是含有所述成分的合适的配合物、组合物或混合物。另外，具有 PPAR δ 激活作用的化合物，表示能通过像“PPAR 配体”那样与 PPAR 结合，调控 PPAR 的靶基因的转录激活功能的化合物。所述化合物不局限于天然存在的化合物，而且还包括人工合成的化合物。

为了说明上述有效成分的作用，通过向实施例中所示的各种类型的骨骼肌细胞或脂肪细胞中添加各种类型的 PPAR 配体，测定 UCP1 的 mRNA 的数量。结果，证实了与测定的 PPAR α 和 PPAR γ 配体相比，PPAR δ 配体表现出 UCP1 的 mRNA 的明显更大数量的表达。PPAR δ 配体的例子包括 p-(3-(4-乙酰基-3-羟基-2-丙基苯氧基)-丙氧基)苯乙酸 (YM-16638)，该配体作为具有例如降血液胆固醇活性作用的化合物披露于 WO9904815 中。

可以使用报导基因，通过一种简单方法，以很高的灵敏度确定一种物质的 PPAR 结合程度和/或激活程度。例如，以下方法是已知的：使

用融合蛋白表达载体的方法，该载体是通过将酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合结构域与 PPAR 的配体结合结构域融合而获得的，以及使用一种动物细胞的方法，其中，业已转导了含有与 GAL4 响应序列（GAL4 结合元件）连接的报导基因的报导质粒（WO96/33724; Lehmann 等, *J. Biol. Chem.*, 270, 12953-12956 (1995); 和 Willson 等, *J. Med. Chem.*, 39, 665-668 (1996)）。使用报导基因的方法是按以下方式实施的：首先，当测试化合物是诸如能结合或激活 PPAR 的物质时，该测试化合物与 GAL4 的 PPAR 的配体结合结构域结合。于是，与 PPAR 的配体结合结构域融合的 GAL4 的 DNA 结合结构域与报导质粒的 GAL4 响应因子结合，以便启动所述报导基因的表达。通过测定由所述报导基因表达的蛋白的活性等，就是说通过检测所述报导物活性，可以确定所述测试化合物是 PPAR 结合化合物或 PPAR 激活化合物，或者不是。

因此，在筛选能结合 PPAR 的未知配体时，或在确定一种测试化合物是否是 PPAR 结合配体的检验中，检测和分离天然或人工合成的配体是可行的。另外，报导物活性的检测可以根据本领域的技术，通过根据报导基因的类型，从染色、荧光、细胞活性中选择的指标适当地完成。

另外，在本发明的筛选方法中，在上述系统中选择性地增加以下步骤，以便检测报导物活性：（a）让一种测试样品与 UCP1 基因表达细胞接触或导入该细胞，（b）测定 UCP1 基因在所述细胞中的表达量，和（c）筛选能增加 UCP1 基因在所述细胞中的表达量的化合物。

被用于筛选的“UCP1 基因表达细胞”没有特别限制，优选的是诸如白色脂肪细胞或褐色脂肪细胞的脂肪细胞或骨骼肌细胞。所述细胞可以从动物组织中分离的原代培养细胞，或通过细胞的癌化或不死化制备的建立细胞系。作为脂肪细胞，例如，各种类型的脂肪细胞，如披露于以下实施例中的人类白色脂肪细胞、大鼠褐色脂肪细胞、3T3-L1（小鼠脂肪细胞）可以优选使用，而作为骨骼肌细胞，例如，各种类型的骨骼肌细胞，如 SkMC（人骨骼肌细胞）和 C2C12（小鼠骨骼肌细胞）可以优选使用。另外，UCP 家族（解偶联蛋白同系物）基因的例子包括 UCP1 基因、UCP2 基因、UCP3 基因、UCP4 基因。

在本发明筛选方法的一个步骤中，让测试样品与能表达 UCP1 基因

的细胞接触和/或导入该细胞，并且测定 UCP1 基因的表达量。为了测定所述基因的表达量，可以使用本领域技术人员所熟知的各种类型的方法。所述基因表达的测定可以通过测定 DNA、RNA 或蛋白的量实现，例如，通过 Northern 印迹方法 (Sambrook 等, Molecular Cloning, 201-206, (1987), Cold Spring Harbor Laboratory), RT-PCR 方法 (Shaffer 等, Anal. Biochem., 190, 292-296 (1990)) 等。

当通过所述测定检测到 UCP1 基因表达的显著增强时，所述测试样品的化合物就被认为具有促进 nST 功能的作用。UCP1 的表达是在 nST 组织的细胞中的线粒体中燃烧脂肪或糖所必需的。不过，本发明的有效成分，具有显著提高 UCP1 在上述组织的细胞中的表达量的作用。通过以上分子水平上的发现可以了解，本发明的药剂能有效抑制内脏脂肪积累和减少内脏脂肪积累。

实际上，在实施例 1 中，为了证实 UCP (其表达是由 PPAR δ 促进的) 能够发挥抑制或减少内脏脂肪积累的作用，就是说加速细胞内死亡和糖类的燃烧，将各种类型的 PPAR 配体添加到所述原代人脂肪细胞中，并且测定脂肪酸 β 氧化作用 (已知这种氧化作用是脂肪酸燃烧促进作用的指标)。正如在实施例 1 中具体示出的，对脂肪酸 β 氧化作用的促进，与 UCP 表达量成正比。在 PPAR δ 配体中，对脂肪酸 β 氧化作用的促进最强。

本发明的药剂具有提高内膜穿透型蛋白 UCP1 在诸如骨骼肌和脂肪的非战栗产热组织细胞的线粒体中的表达量的作用，它与 nST 相关，特别是与促进上述细胞的线粒体中的解偶联呼吸、质子泄漏和产热相关。本发明的药剂包括具有 PPAR δ 激活作用的化合物或它的衍生物作为有效成分，并且它具有高度表达 UCP1 的作用，其中，所述作用大大提高了 UCP1 在诸如上述脂肪和骨骼肌的 nST 组织中的细胞表达量。可以根据 UCP1 表达活性鉴定、分离和纯化本发明的药剂。通过作为有效成分化合由此获得的物质，可以制备用于降低内脏脂肪积累量或用于抑制内脏脂肪积累的、特别是对抗肥胖具有显著作用的药剂。

本发明的药剂可用于治疗肥胖，特别是治疗哺乳动物 (例如人类、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猴、猫、马、兔子等) 或禽类的肥胖，因为它能促进能量代谢和脂肪代谢，并且降低血脂。另外，它还可用

于预防或治疗与肥胖并发的疾病（例如，成年人疾病，如糖尿病、高血压、高血脂、动脉硬化或缺血性心脏病）等。

作为所述降低药剂或抑制药剂的载体，可以根据使用模式使用合适的填充剂、结合剂、增量剂、崩解剂、表面活性剂、防湿剂、赋形剂、稀释剂等。药剂的形状可以根据使用目的适当地确定，并且没有特殊限制。所述药剂的例子包括固体药剂（如片剂、颗粒、粉末、丸剂和胶囊），液体药剂，悬浮剂、乳剂等。通过这种方式获得的抗糖尿病药剂，抗肥胖药剂，减少内脏积累脂肪的药剂或抑制内脏积累脂肪的药剂，优选是通过口服施用的。所述剂量是根据要治疗的患者的症状等适当确定的。因此，每天服用的剂量和次数等没有特殊限制。

实施例

下面将结合实施例对本发明作进一步的详细说明，不过，本发明并不局限于这些实施例。在以下实施例中，每一种操作都是按照披露于“Molecular Cloning”中的方法进行的（Sambrook, J., Fritsch, E.F. 和 Maniatis, T, Cold Spring Harbor Laboratory Press），除非另有说明。

[实施例 1] 药剂对诱导 UCP1 和 UCP2 mRNA 在人类白色脂肪细胞中表达的影响

(1) 人类白色脂肪细胞的培养和 RNA 的制备

人类脂肪细胞，来自皮下脂肪组织的未分化的冷冻原脂肪细胞（Cat. No. SP-F, Lot. No. L011399）是从美国 ZenBio 公司购买的。按照生产商的说明，在 24 孔平板上培养所述细胞，并且分化成脂肪细胞。将所培养的细胞用作人类白色脂肪组织衍生的脂肪细胞。具体地讲，通过使用 24 孔平板在二氧化碳培养箱中，在 37°C 下在原脂肪细胞培养基中培养所述原脂肪细胞，直到达到铺满状态。然后，将所述培养基更换成分化培养基，并且再继续培养 72 小时，以便诱导分化。另外，将所述培养基更换成脂肪细胞培养基，并且进行 14 天培养，以便获得完全分化的白色脂肪细胞。在以下条件下，对所述培养细胞进行进一步的培养。

将各种类型的测试化合物分别添加到培养基中，使它的最终浓度

为 10 μ M, 并且将所述细胞培养 6 小时 (n=3)。所述测试化合物是 PPAR α 配体必降脂(Bezafibrate)、WY14643、PPAR δ 配体 YM-16638、PPAR γ 配体曲格列酮(Troglitazone)、罗格列酮(Rosiglitazone)、非专一性 PPAR 配体 cPGI、伊洛前列素、 β 3 肾上腺素能受体激动剂 L755507。通过添加 DMSO 制备对照, 它是所述测试化合物的溶剂, 使它的最终浓度为 0.5%, 并且以与测试化合物相同的方式用它进行培养。对于每一种测试化合物或对照来说, 回收培养的细胞, 将它们悬浮在 150 微升的细胞裂解缓冲液 (RLT 溶液, 由 QIAGEN 公司生产) 中, 然后裂解细胞, 以便获得细胞提取物。通过使用 RNA 制备试剂盒(商品名: RNeasy 总 RNA 试剂盒, 由 QIAGEN 公司生产)按照该试剂盒所附带的说明书, 从所述细胞提取物中制备总 RNA。

(2) UCP1 mRNA 表达量的测定

通过使用上面所获得的总 RNA (大约 0.1 微克) 作模板, 按下文所述方法进行实时聚合酶链式反应 (RT-PCR), 以便测定 UCP1 mRNA 表达量。

作为人 UCP1 基因的 PCR 引物, 使用了两种类型的寡核苷酸: 5'-AACCCACAGAGGTCGTGAAAG-3' (正向引物) 和 5'-CGTGTAGCGAGGTTTGATTCC-3' (反向引物)。作为 PCR 探针, 使用了 5'-CAGACTTCAAGCATAGAGCCATCTCCA-3', 所述探针是用一种荧光染料 FAM 标记过的。另外, G3PDH mRNA 的测定是按照 PE Applied Biosystems 推荐的方法进行的, 该测定是与 2-Reporter Assay 同时进行的。所述引物是由 Amersham-Pharmacia Biotech 公司化学合成的, 而所述探针是由 PE Applied Biosystems 公司化学合成的 (包括用所述荧光染料标记)。

通过使用待测定的制备的总 RNA, 上面所提到的引物和探针, 以及通过商业渠道获得的实时检测 PCR 试剂盒 (TaqMan EZ RT-PCR Core Reagent Kit (商品名), 由 PE Applied Biosystems 公司生产) 制备表 1 所示的反应溶液, 表中所示出的用量相应于一个反应试管。

[表 1]

成分	终浓度
模板 RNA	
5 × TaqMan EZ 缓冲液 A	1 ×
10 mM dATP	300μM
10 mM dGTP	300μM
10 mM dCTP	300μM
10 mM dTTP	300μM
10μM UCP1 正向引物	200nM
10μM UCP1 反向引物	200nM
5μM UCP1 探针	100nM
10μM G3PDH 正向引物	40nM
10μM G3PDH 反向引物	40nM
10μM G3PDH 探针	100nM
rTth DNA 聚合酶(2.5U/μl)	0.1U/μl
AMP Erase UNG(1U/μl)	0.01U/μl
25mM Mn(OAc) ₂	3mM

将 25 微升如上制备的反应溶液放入 PCR Perkin Elmer Microamp Optical Tuber (商品名, 由 PE Applied Biosystems 公司生产) 中, 并且用一个盖子密封所述试管。将该试管放在 ABI PRISM 7700 序列检测系统 (商品名, 由 PE Applied Biosystems 公司生产), 并且在以下条件下进行反应。

在 50°C 下用 50 分钟时间由 UNG 分解 DNA 污染物, 在 60°C 下进行逆转录处理 10 分钟, 并且在 95°C 下加热 2 分钟使 UNG 失活。在随后的 PCR 反应中, 在 95°C 下进行 15 秒钟的变性处理, 并且在 58°C 下进行 90 秒钟的退火处理 (循环次数: 40 循环)。在该反应开始之后, 通过实时处理自动确定荧光强度, 以便测定 UCP1 mRNA 表达量。UCP1 mRNA 表达量是通过一种相对值表示的, 该相对值是通过将被用作空白对照的参考样品中的量设定为 100, 并且通过 G3PDH mRNA 表达量对所述值进行校正而计算的。

结果如图 1 所示。PPAR δ 配体（具有激活 PPAR δ 的作用的化合物）YM-16638 能够将 UCP1 mRNA 表达量提高到对照表达量的大约 12 倍。这表明，PPAR δ 配体能有效促进所述表达。由于该实验证实了 PPAR δ 配体能专一性地增强 UCP1 基因，很显然，PPAR δ 配体对 WAT 的功能的促进作用，是由于 PPAR δ 配体对 WAT 的直接作用。UCP1 表达的显著加强不仅出现在啮齿类动物，而且还出现在人类的白色脂肪细胞中这一事实表明，PPAR δ 配体对于人类糖尿病和肥胖来说是极其有效的。

(3) UCP2 mRNA 表达量的测定

通过使用在上面的第 (1) 项获得的总 RNA（大约 0.1 微克）作模板，通过与上述第 (2) 项相同的实时聚合酶链式反应，测定 UCP2 mRNA 表达量。作为人类 UCP2 基因的 PCR 引物，使用了两种类型的寡核苷酸：5'-CGCCAAATGAGCTTTGCCT-3'（正向引物）和 5'-GCCCTTGGTGTAGAACTGTTTGA-3'（反向引物）。作为 PCR 探针，使用了 5'-TGTCCGCATCGGCCTGTATGATTC-3'。所述探针用一种荧光染料 FAM 标记。

结果如图 2 所示。PPAR δ 配体（具有激活 PPAR δ 的作用的化合物）YM-16638 能够将 UCP2 mRNA 表达量提高到对照表达量的大约 2 倍。

[实施例 2] 药剂对人类白色脂肪细胞中游离脂肪酸 β 氧化的影响

按与实施例 1 相同的方法制备人类完全分化的白色脂肪细胞，然后除去上清液，添加 500 微升培养基，该培养基是通过向脂肪细胞培养基中添加适量的油酸和棕榈酸，使它们的浓度分别为 0.67mM 和 0.33mM 而制备的。将各种类型的测试化合物添加到所述培养基中，使它们的最终浓度为 10 μ M，然后向每一个孔中添加 [9,10(n)-³H] 棕榈酸（由 Amersham Pharmacia 公司生产），最终浓度为 1 μ Ci/毫升，并且，在 37°C 下培养所述细胞 48 小时。所述测试化合物是 PPAR δ 配体的 YM-16638，PPAR α 配体的 WY14643， β 3 肾上腺素能受体激动剂的 L75507 和 PPAR γ 配体的 Rosiglitazone。通过添加 DMSO 制备对照，DMSO 是所述测试化合物的溶剂，使它的最终浓度为 0.5%，并且以与

测试化合物相同的方式培养。为了防止在培养期间由于细胞对 [9,10(n)-³H]棕榈酸的β氧化所产生的³H₂O的蒸发，用由住友 Bakelite 公司生产的微型培养滤膜 (MS-30055) 对培养平板进行密封。

在培养 48 小时之后，将培养基的 200 微升上清液转移到一个 1.5 毫升的 Eppendorf 管中，添加 50 微升 50% 的三氯乙酸，并且将该试管放在冰上保持 30 分钟，以便产生沉淀，并且以 15000rpm 的速度离心该混合物 10 分钟。然后，将没有盖子的 1.5 毫升 Eppendorf 管放入事先在它里面放入了 500 微升蒸馏水的 20 毫升的玻璃瓶中，将上面所获得的上清液的总量放入该 Eppendorf 管，并且用聚丙烯封装盖紧密密封所述玻璃瓶。在 50℃ 下对所述玻璃瓶进行加热 18 小时，以便所述玻璃瓶内部被³H₂O 饱和，在 4℃ 下对所述玻璃瓶进行冷却之后，再进行离心 (1000rpm, 1 分钟)。丢弃瓶中 Eppendorf 管中残留的上清和 Eppendorf 管。向留在所述玻璃瓶中的含有³H₂O 的蒸馏水中添加 5 毫升液体闪烁混合物 (Ultima Gold, 由 Packard 公司生产)，并且在充分混合之后测定放射性。

结果如图 3 所示。10 μM 的 PPAR δ 配体 YM16638 将所述细胞的β氧化作用提高了 30%。另一方面，10 μM 的 PPAR γ 配体 Rosiglitazone 具有 15% 的增强作用，而 10 μM 的 PPAR α 配体 WY14643 和 10 μM 的 β3 肾上腺素能受体激动剂 L755507 的β氧化，没有表现出增强作用。以上结果表现出与在实施例 1 中观察到的各种类型的 PPAR 配体对 UCP1 mRNA 表达的促进作用的良好的相关性。就是说，PPAR δ 配体通过促进 UCP1 基因表达提高了 UCP1 蛋白的数量，以便增强用游离脂肪酸作底物的β氧化。所述β氧化作用是 UCP1 的功能之一。这表明 PPAR δ 配体能促进能量代谢，并且抑制或减少内脏脂肪积累。以上结果表明 PPAR δ 配体能有效抗人类糖尿病和肥胖。

产业上利用的可能性

本发明获得了一种具有产热促进作用等的物质，并且获得了诸如抗糖尿病药剂、抗肥胖药剂、减少内脏积累脂肪的药剂或抑制内脏积累脂肪的药剂的含有所述物质的药剂。

序列表

<110> 帝人公司

山冈一良

高木健一郎

片冈健一郎

山本真则

近西俊洋

<120> 通过测定 PPAR δ 激活作用筛选物质的方法和药剂

<130> T-456

<150> JP P2001-216502

<151> 2001-7-17

<160> 6

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 UCP1 基因 PCR 的正向引物

<400> 1

aacccacaga ggtcgtgaaa g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 UCP1 基因 PCR 的反向引物

<400> 2

cgtgtagcga ggtttgattc c 21

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 UCP1 基因 PCR 的探针

<400> 3

cagacttcaa gcatagagcc atctcca 27

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 UCP2 基因 PCR 的正向引物

<400> 4

cgc caaaatga gctttgcct 19

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 UCP2 基因 PCR 的反向引物

<400> 5

gcccccttggctg tagaactggtt tga 23

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人 UCP2 基因 PCR 的探针

<400> 6

tgtccgcatac ggccctgtatg attc 24

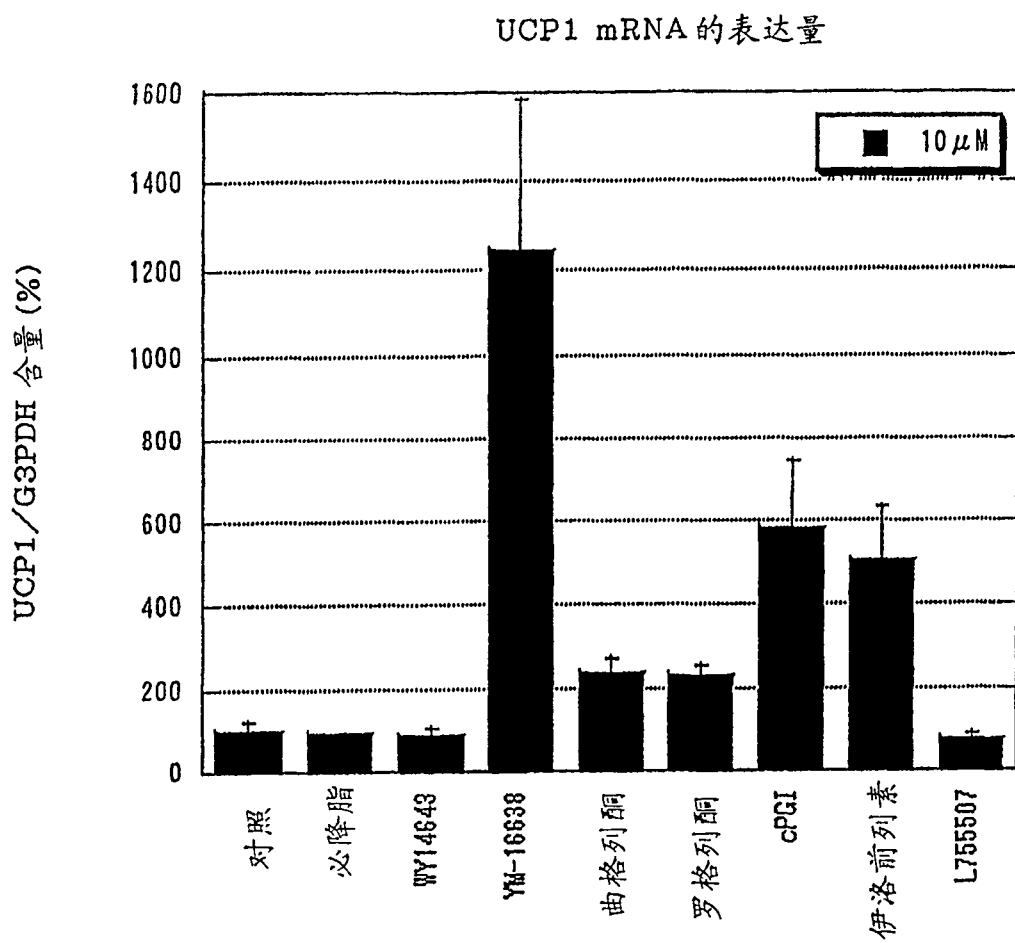


图 1

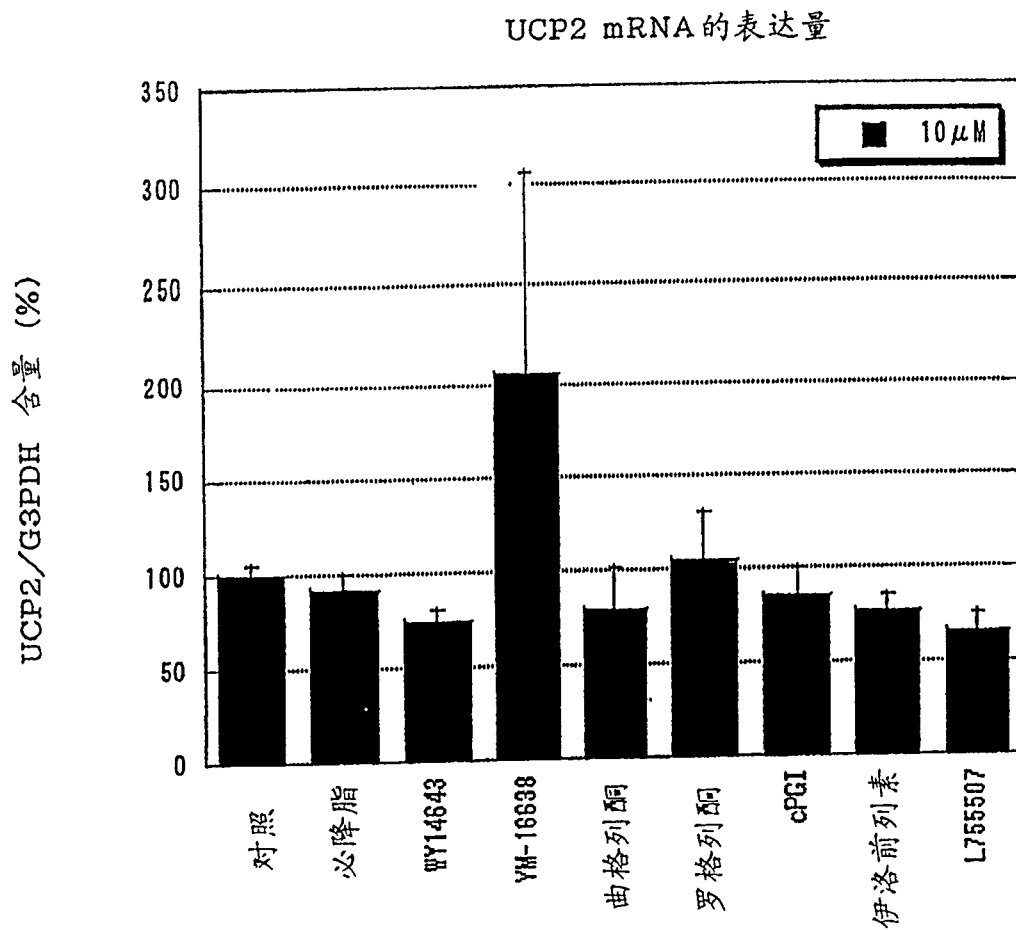


图 2

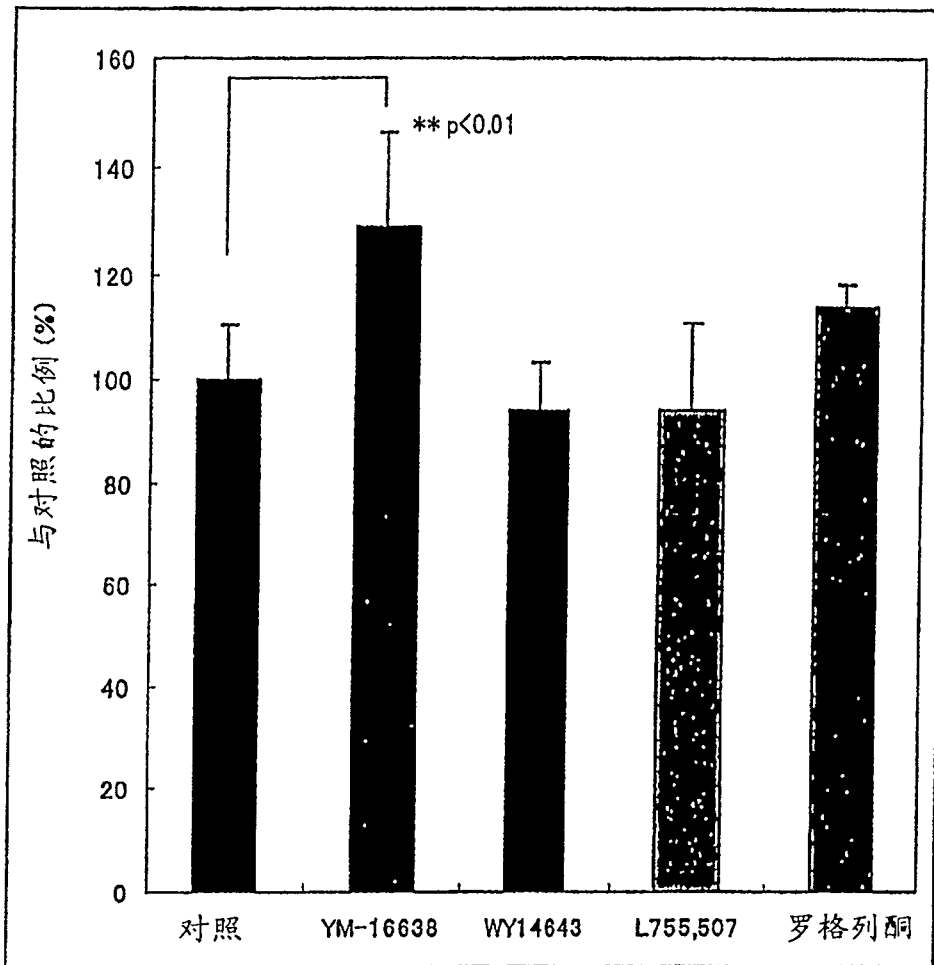


图 3