

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105147708 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201510413063. 4

(22) 申请日 2015. 07. 14

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 赫荣乔 苏涛 陈茜茜 魏艳

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 31/675(2006. 01)

A61P 3/00(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

苯磷硫胺用于治疗核糖代谢相关疾病的用途

(57) 摘要

本发明涉及苯磷硫胺用于治疗核糖代谢相关疾病的用途,具体是采用苯磷硫胺降低体内核糖水平,同时减少内源核糖蓄积后的毒性。研究表明内源核糖蓄积后,会导致糖基化终末产物的增加,产生细胞毒性,导致机体功能损伤,如参与糖尿病、老年痴呆等核糖相关疾病。本发明中苯磷硫胺的使用能够有效降低体内核糖水平,改善疾病。

1. 苯磷硫胺用于制备降低体内核糖水平的药物的用途。
2. 苯磷硫胺用于制备减少内源核糖蓄积后毒性的药物的用途。
3. 苯磷硫胺用于制备降低体内糖化血红蛋白水平的药物的用途。
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的用途,所述降低体内核糖水平、减少内源核糖蓄积后毒性,以及低体内糖化血红蛋白水平,通过促进磷酸戊糖途径中的转酮醇酶活性来实现。
5. 苯磷硫胺用于制备通过促进参与磷酸戊糖途径中的转酮醇酶活性,治疗核糖代谢失调引起的相关疾病的药物的用途。
6. 苯磷硫胺用于制备通过降低体内核糖水平,治疗核糖代谢失调引起的相关疾病的药物的用途。
7. 根据权利要求 5 或 6 所述的用途,所述核糖代谢失调引起的相关疾病包括糖尿病、老年痴呆、动脉粥样硬化。

苯磷硫胺用于治疗核糖代谢相关疾病的用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及苯磷硫胺的一种改善核糖代谢失调引起的相关疾病,如糖尿病、老年痴呆、动脉粥样硬化等疾病的新用途。

背景技术

[0002] 自从 1815 年,法国化学家 Chevreul ME 发现糖尿病患者尿液的甜味是由葡萄糖所致,历时 200 年,糖尿病被认为是一组以慢性血葡萄糖(简称血糖)水平增高为特征的代谢病群,即葡萄糖代谢失调是糖尿病发生发展的最主要原因 [1]。由于葡萄糖对蛋白质的非酶促糖基化(glycation),导致体内蛋白质结构改变与功能丧失 [2]。非酶促糖基化产生的糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)具有较强的细胞毒性,在体内蓄积,使细胞代谢发生紊乱甚至死亡,是糖尿病并发症发生发展的主要原因 [3]

[0003] 体内核糖过度蓄积能否导致相关疾病,值得高度重视,其理由是:a. 2 型糖尿病患者尿核糖显著高于正常对照,提示其血中的核糖水平也相对较高;b. 核糖与葡萄糖一样,广泛存在与机体内的各个组织器官 [4];c. 核糖能够迅速导致蛋白质糖基化,生成 AGEs,相比之下,葡萄糖则明显较慢 [5];d. 相同条件下,蛋白质核糖糖基化产物的细胞毒性远较葡萄糖的产物强 [6, 7];e. 核糖容易透过血脑屏障 [8],引起中枢神经系统蛋白质糖基化和 AGEs 的累积 [9]。

[0004] 老年痴呆也可以称为 3 型糖尿病,血糖升高是痴呆的危险因素之一,尤其是糖尿病人体内的糖化血红蛋白升高后危害更大。研究发现,按照每千克体重腹腔注射 2g 核糖到小鼠体内,发现小鼠血清蛋白和脑内蛋白质的糖基化水平提高了,并且提高了脑内 Tau 蛋白磷酸化水平,脑内的海马区的星型胶质细胞激活,小鼠的空间记忆能力出现损伤。而用相同浓度的葡萄糖则没有检测到 AGEs 的明显蓄积 [10]。所以,这不仅提示我们,AGEs 在脑内积累导致认知功能损伤,并且相比较葡萄糖,核糖诱导蛋白质产生 AGEs 的能力更强,生成的产物毒性更大。

发明内容

[0005] 本发明的发明人发现苯磷硫胺可以通过促进参与磷酸戊糖途径中的转酮醇酶活性,达到降低核糖的目的。从而改善核糖代谢失调引起的相关疾病,如糖尿病、老年痴呆、动脉粥样硬化等。

[0006] 具体地,本发明涉及以下各项:

[0007] 1. 苯磷硫胺用于制备降低体内核糖水平的药物的用途。

[0008] 2. 苯磷硫胺用于制备减少内源核糖蓄积后毒性的药物的用途。

[0009] 3. 苯磷硫胺用于制备降低体内糖化血红蛋白水平的药物的用途。

[0010] 4. 根据 1-3 任一项所述的用途,所述降低体内核糖水平、减少内源核糖蓄积后毒性,以及低体内糖化血红蛋白水平,通过促进磷酸戊糖途径中的转酮醇酶活性来实现。

[0011] 5. 苯磷硫胺用于制备通过促进参与磷酸戊糖途径中的转酮醇酶活性,治疗核糖代

谢失调引起的相关疾病的药物的用途。

[0012] 6. 苯磷硫胺用于制备通过降低体内核糖水平,治疗核糖代谢失调引起的相关疾病的药物的用途。

[0013] 7. 根据5或6所述的用途,所述核糖代谢失调引起的相关疾病包括糖尿病、老年痴呆、动脉粥样硬化。

附图说明

[0014] 图1:大鼠体重(A)、血糖水平(B)、血清中胰岛素水平(C)、血清中胰岛素C肽水平(D)、胰岛素抗体水平(E)、胰高血糖素水平(F)。

[0015] 图2:ZDF大鼠诱导前与诱导后尿核糖(A)、尿葡萄糖(B)水平变化,说明2型糖尿病中核糖与葡萄糖浓度都会显著升高($P<0.001$);(C)苯磷硫胺灌胃四个月中核糖水平变化,2型糖尿病组尿核糖水平始终高于对照组,苯磷硫胺灌胃4周后,灌胃组尿核糖水平要显著低于2型糖尿病组,与对照组无显著差异;灌胃8周后,停止灌胃苯磷硫胺,尿核糖水平显著升高,与2型糖尿病组无显著差异;说明苯磷硫胺能显著降低尿核糖水平,是维持尿核糖水平正常的关键因素。

[0016] 图3:灌胃四个月,苯磷硫胺灌胃组导致血清核糖水平(A)与糖化血红蛋白水平(B)都显著低于2型糖尿病组大鼠,说明苯磷硫胺灌胃不仅显著降低核糖水平,也降低了糖化血红蛋白水平。

[0017] 图4:灌胃四个月,苯磷硫胺灌胃组的肝脏(A)、肾脏(B)和血清(C)中糖基化终末产物(AGEs)显著低于2型糖尿病组。

[0018] 图5:灌胃四个月,苯磷硫胺灌胃组的转酮醇酶(TK)的mRNA水平(C、C')与蛋白质表达水平(A、B)显著高于2型糖尿病组。

具体实施方式

[0019] 动物:

[0020] 2型糖尿病鼠ZDF大鼠瘦型对照组(fa/+),模型组(fa/fa),购自北京维通利华公司。均饲养于无病原体的专用IVC鼠笼中,提供SPF级鼠饲料和无菌饮用水;所有动物实验均依照美国国立卫生研究院(NIH)颁布的实验动物饲养与使用守则,并经中国科学院生物物理研究所生物医学研究道德委员会的批准(SYXK2013-33)。

[0021] 试剂:

[0022] 1%羧甲基纤维素钠(美国sigma公司),苯磷硫胺(中国西安瑞林生物科技有限公司),苯磷硫胺溶液浓度为75mg/ml,溶于1%羧甲基纤维素钠中。高脂饲料Purina#5008(北京维通利华公司),anti-AGEs抗体购自TransGenic公司(日本);anti-G6PD抗体购自Invitrogen公司(美国);Anti-TK, Anti- β -actin抗体购自Sigma公司(美国)。大鼠糖化血红蛋白A1c(GHbA1c)酶联免疫试剂盒(TSZ品牌,中国上海)。血清中胰岛素,胰岛素C肽,胰岛素抗体,胰高血糖素浓度检测试剂购自北方生物技术研究所以(中国北京)。

[0023] 仪器:

[0024] LC-20A高效液相色谱仪UV-HPLC(日本岛津公司)。Rotor-Gene Q实时荧光定量

PCR 分析仪 (德国 QIAGEN 公司)。小型垂直电泳仪 (美国伯乐公司)。DFM-96 型多管放射免疫计数器 (中国众诚机电技术公司)。

[0025] 实验步骤:

[0026] 1. 购买 8 周 ZDF 大鼠瘦型对照组 (fa/+) 7 只, ZDF 大鼠模型组 (fa/fa) 21 只, 用高脂饲料 Purina#5008 饲养所有 ZDF 大鼠 4 周, 诱导大鼠产生糖尿病, 随后随机分成 3 组, 每组 7 只。包括 2 型糖尿病组 (也称为糖尿病组), 灌胃苯磷硫胺组 (也称为灌胃组) 和恢复组。ZDF 大鼠对照组 (也称为对照组) 为瘦型大鼠, 是不发生 2 型糖尿病的健康对照组, 2 型糖尿病组为肥胖大鼠并发发生 2 型糖尿病, 同时灌胃 1% 羧甲基纤维素钠 (苯磷硫胺的溶剂)。恢复组为灌胃苯磷硫胺两个月后, 继续灌胃 1% 羧甲基纤维素钠两个月。

[0027] 2. 用大鼠代谢笼 DXL-D (江苏苏杭科技器材有限公司, 中国), 收集高脂饲料诱导前、诱导后的大鼠尿液, 灌胃后每隔两周收集尿液一次。收集的尿液马上用高效液相色谱 (HPLC) 检测核糖浓度。

[0028] 3. 开始灌胃苯磷硫胺溶液四个月, 用 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 摘眼球取血, 离心后取血清, 用于检测血清中葡萄糖、胰岛素、胰岛素 c 肽、胰岛素抗体与胰高血糖素等指标。然后用生理盐水进行灌流, 清除组织中的血液。灌流 30 分钟后, 在冰上取动物的肝脏、肾脏、大脑皮层、海马组织, 置于液氮速冻后放于 -80℃ 保存。

[0029] 4. 0.1 克组织加 1ml RIPA 裂解液 (北京碧云天生物科技公司, 中国), 按照 1:100 加入蛋白酶抑制剂 (上海生工生物工程有限公司, 中国), 用研磨器匀浆, 离心后取上清。加入上样缓冲液, 沸水浴 10min, 上样于 10% SDS-PAGE 进行电泳分离 (浓缩胶: 100V, 分离胶: 140V), 然后转印于 PVDF 膜, 并用 5% 脱脂牛奶 (溶解于 TBST (含 0.1% Tween-20 的 TBS 缓冲液) 中) 封闭非特异性结合位点, 室温 1h。然后进行一抗孵育 (anti-AGEs, 1:3000; anti-G6PD, 1:1000, anti-TK, 1:1000), 4℃ 过夜。用 TBST 洗 PVDF 膜, 10min/次, 3 次, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的山羊抗鼠 / 兔二抗 (1:5000) 孵育, 室温 1h。随后用 TBST 洗膜, 10min/次, 3 次, 用 ECL 超敏发光液淋洗 PVDF 膜, 并对 X-光片进行曝、显影、定影, 显示目的蛋白条带。用 Quantity One 4.6.2 (BioRad) 进行灰度扫描, 统计结果。

[0030] 5. 总 RNA 提取使用德国 Qiagen 公司的 RNeasy Micro Kit, 具体方法参见说明书。cDNA 第一条链合成使用 Promega 公司的 M-MLV 逆转录酶。不同基因使用的引物如下表:

[0031]

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
TK	Tteggtcggtccctatgt (SEQ ID NO:1)	Ggaaatcctcgttggtgctat (SEQ ID NO:2)
β -actin	Caccegegagtacaaccttc (SEQ ID NO:3)	Cccataccaccatcacacc (SEQ ID NO:4)
GAPDH	Acagcaacagggtggtggac (SEQ ID NO:5)	Tttgagggtgcagcgaactt (SEQ ID NO:6)

[0032] PCR 反应循环数根据每个基因的自身特征从 24 个循环到 30 个循环不等。TK 的退

火温度为 52 度,其余为 56 度。对于实时定量 (realtime quantitative)PCR, cDNA 模板稀释 10 倍后使用,采用全式金公司的 TransStart Green qPCR SuperMix UDG kit,相对表达水平的比较采用 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 法,具体方法参见说明书,每个实验重复三次。

[0033] 结果分析

[0034] 给实验动物灌胃苯磷硫胺四个月,2 型糖尿病组、灌胃组与恢复组大鼠的体重、血糖水平、胰岛素、胰岛素 c 肽、胰岛素抗体与胰高血糖素都显著高于 ($p < 0.001$) 瘦型对照组 (图 1),说明灌胃苯磷硫胺无法改善体内血糖与胰岛素水平。灌胃苯磷硫胺组与 2 型糖尿病组相比,尿核糖随时间变化 (图 2) 以及血清中核糖浓度 (图 3A) 说明苯磷硫胺可以降低体内核糖浓度。同时,可以显著降低 ($p < 0.001$) 血清中糖化血红蛋白的含量 (图 3B)。通过 western blotting 分析,灌胃苯磷硫胺可以显著降低 ($p < 0.001$) 肝脏、肾脏、血清中 AGEs 的量 (图 4)。同时,real-time PCR 与 western blotting 技术分析表明,灌胃苯磷硫胺后肝脏中转酮醇酶的 mRNA 水平与蛋白表达水平都显著高于 ($p < 0.001$) 2 型糖尿病组与恢复组 (图 5)。提示磷酸戊糖途径中转酮醇酶是体内核糖代谢关键酶。

[0035] 参考文献:

- [0036] [1]Kumar, Vinay, Fausto, et al. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th. Philadelphia, Pa:Saunders, 2005:1194-1195
- [0037] [2]Vlassara H. Advanced glycation in health and disease:role of the modern environment. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1043(1):452-460
- [0038] [3]Melpomeni P, Jaime U, Helen V, et al. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications:what is new and what works. Clinical Diabetes, 2003, 21(4):186
- [0039] [4]Weast, Robert C. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 62nd. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981, p. C-506
- [0040] [5]Wei Y, Chen L, Chen J, et al. Rapid glycation with D-Ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SY5Y cells. BMC Cell Biology, 2009:10:10
- [0041] [6]Chen L, Wei Y, Wang X Q, et al. Ribosylation rapidly induces α -synuclein protein into advanced glycation end products in molten globules with high cytotoxicity. PLoS ONE, 2010, 5(2):e9052
- [0042] [7]Chen L, Wei Y, Wang X Q, et al. D-Ribosylated Tau forms globular aggregates with high cytotoxicity. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(15):2559-2571
- [0043] [8]Agnew W F. Christian crone permeability of brain capillaries to hexoses and pentoses in the rabbit. Acta Physiologica Scandinavica, 1967, 70(20):168-175
- [0044] [9]Wei Y, Han C H, Zhou J, et al. D-Ribose in glycation and protein aggregation. Biochim Biophys Acta, General Subjects, 2012, 1820(4):488-494 [10] Han C, Lu Y, Wei Y, et al. D-ribose induces cellular protein glycation and impairs mouse spatial cognition. PLoS One, 2011. 6(9):e24623.

[0001]

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 苯磷硫胺用于治疗核糖代谢相关疾病的用途

<130> IB157583

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ttcggtcggt ccctatgt

18

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ggaaatcctc gttgtgcta t

21

<210> 3

<211> 20

[0002]

IB157583

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cacccgcgag tacaaccttc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

cccatacca ccatcacacc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

acageaacag ggtggtggac

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

tttgagggtg cagegaactt

20

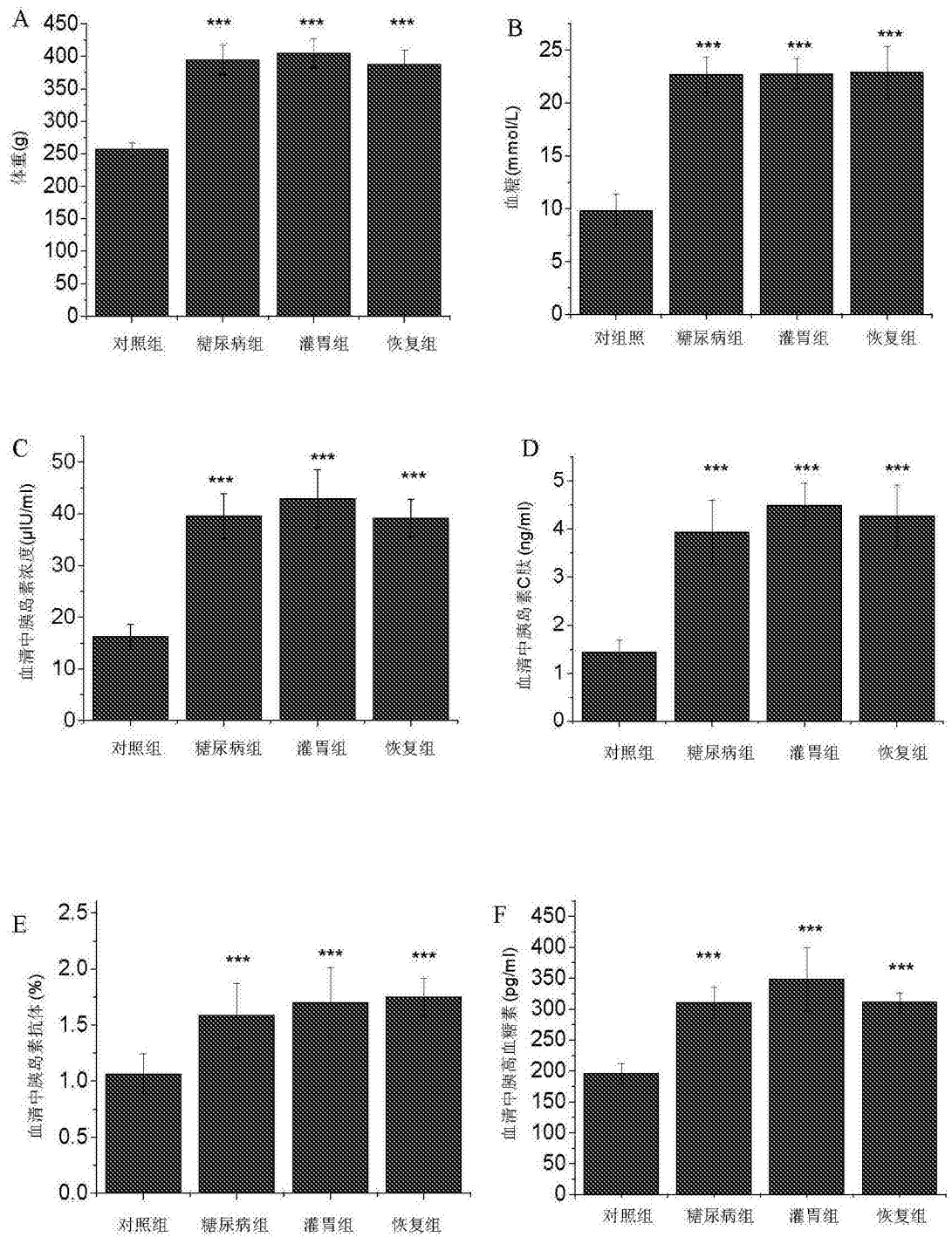


图 1

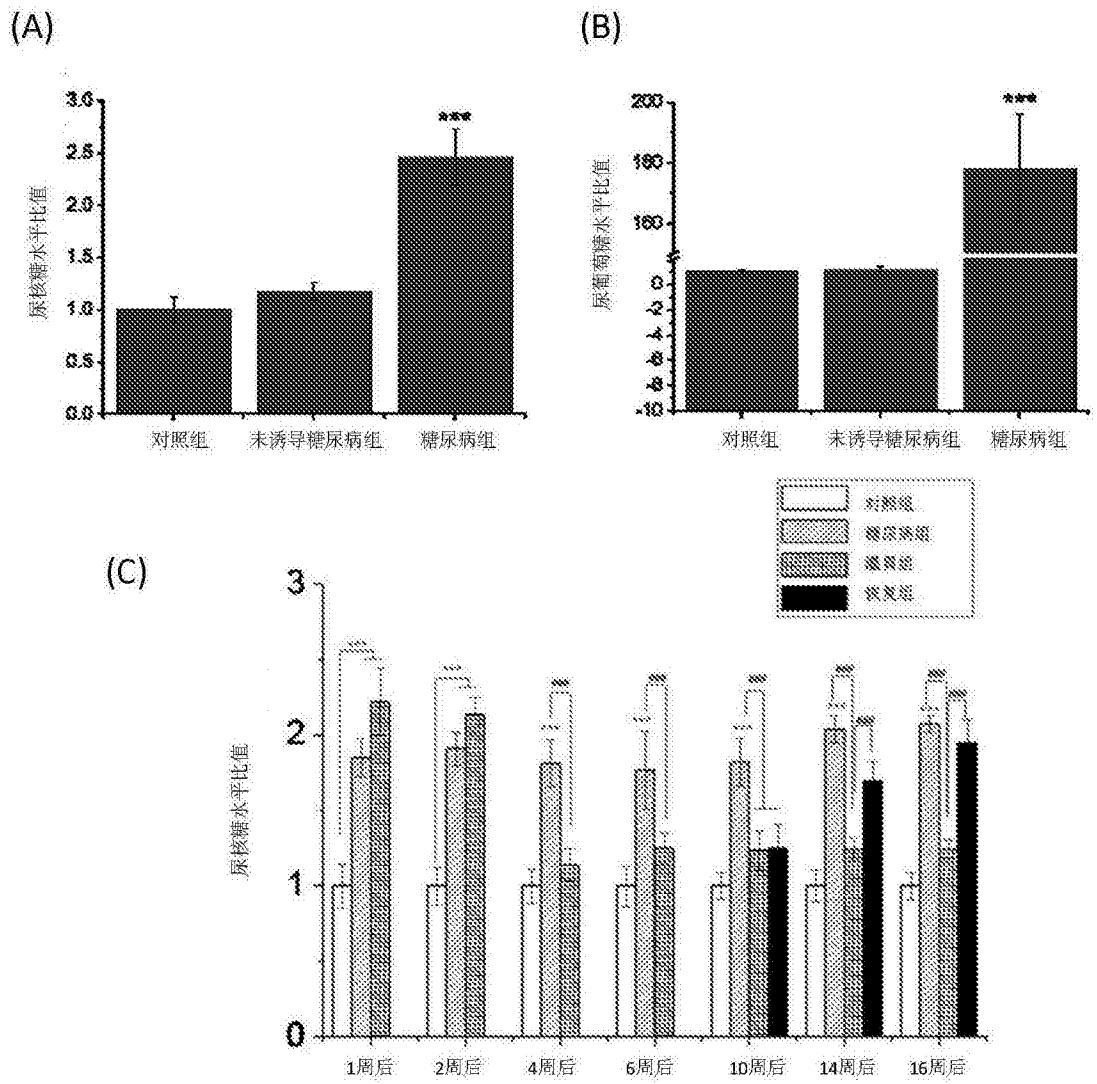


图 2

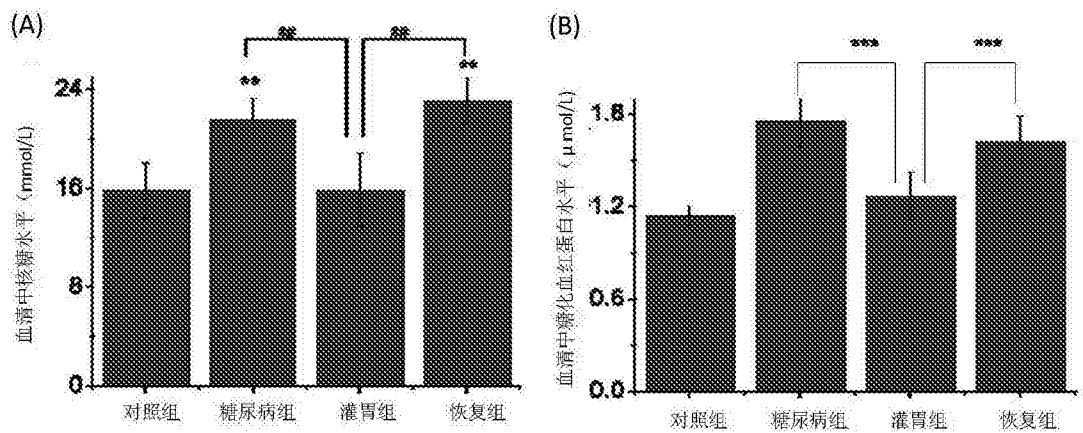


图 3

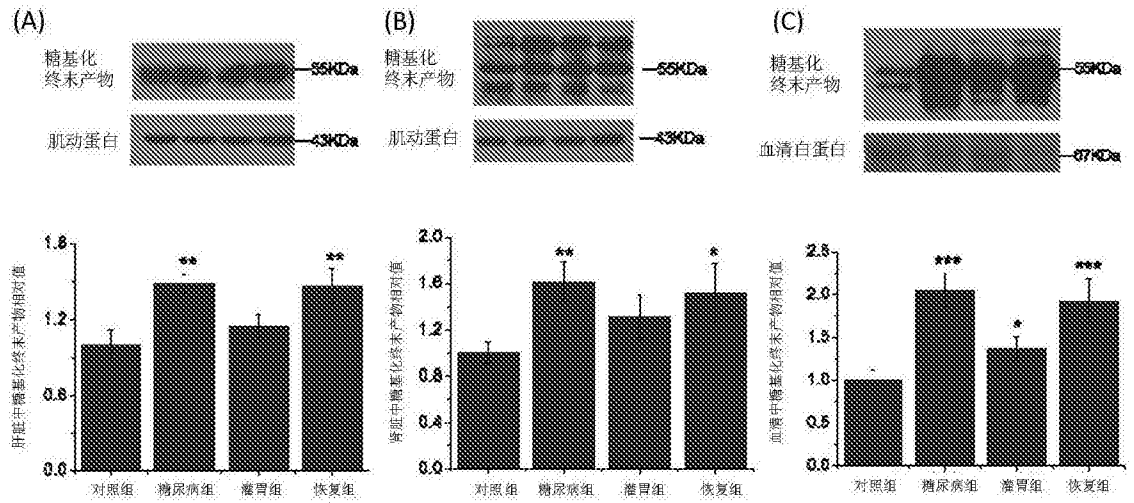


图 4

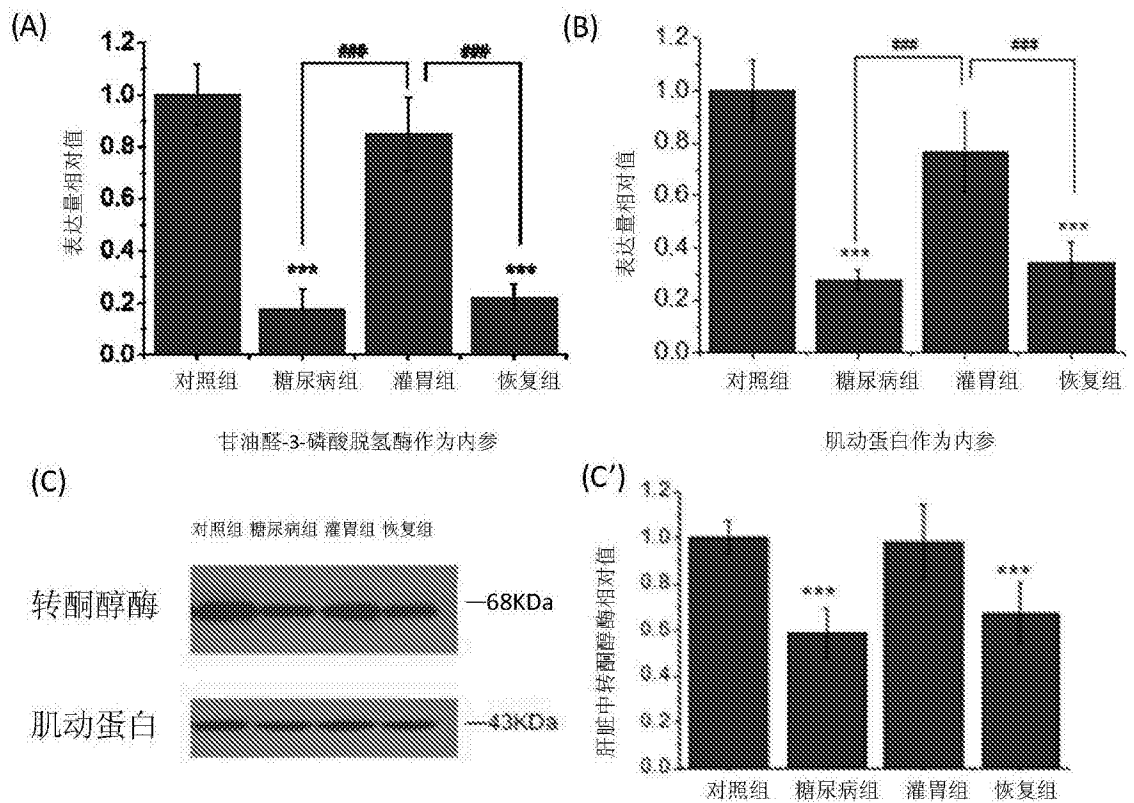


图 5