



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104822378 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201380060932. 9

(22) 申请日 2013. 09. 20

(30) 优先权数据

61/703, 867 2012. 09. 21 US

61/787, 718 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2013/000798 2013. 09. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/043793 EN 2014. 03. 27

(71) 申请人 多伦多大学理事会

地址 加拿大安大略

(72) 发明人 M·惠勒 K·普伦蒂塞 戴菲寒

R·雷特纳卡兰

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 武晨燕 迟姗

(51) Int. Cl.

A61K 31/43(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

A61K 31/196(2006. 01)

A61K 31/198(2006. 01)

A61P 3/08(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

C07D 307/68(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 30/72(2006. 01)

G01N 33/48(2006. 01)

G01N 33/483(2006. 01)

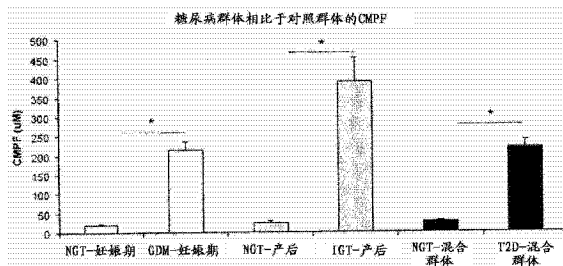
权利要求书4页 说明书29页 附图35页

(54) 发明名称

作为糖尿病的生物标志物的 CMPF 和相关方法

(57) 摘要

本发明提供了用于鉴定或监测患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者的方法。羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 被证实是葡萄糖稳态受损和 / 或特征在于 β-细胞功能障碍的病况的生物标志物。将受试者中的 CMPF 的测试水平与对照水平相比较鉴定出患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者。还提供了引起葡萄糖稳态受损或 β-细胞功能障碍的方法和对影响 β-细胞活性的化合物进行筛选的方法。还提供了通过降低受试者中 CMPF 的生理水平来治疗 β-细胞功能障碍的方法以及 OAT 调节剂用于治疗 β-细胞功能障碍的用途。



1. 一种鉴定患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者的方法,所述方法包括:

(a) 测定来自受试者的样品中 3- 羧基 -4- 甲基 -5- 丙基 -2- 呋喃丙酸 (CMPF) 的测试水平;以及

(b) 将 CMPF 的所述测试水平与对照水平比较,其中 CMPF 的所述测试水平相对于所述对照水平存在差异或相似则表示所述受试者患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损的风险。

2. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法进一步包括在步骤 (a) 之前获得来自所述受试者的样品。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述葡萄糖稳态受损是妊娠期糖尿病、2 型糖尿病、葡萄糖耐量受损、糖尿病前期或胰岛素抵抗。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述葡萄糖稳态受损是葡萄糖耐量受损并且所述对照水平:

i) 代表未患葡萄糖耐量受损的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照增加则表示所述受试者患有葡萄糖耐量受损或有患葡萄糖耐量受损的风险;或

ii) 代表患有葡萄糖耐量受损的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照相似或更大则表示所述受试者患有葡萄糖耐量受损或有患葡萄糖耐量受损的风险。

5. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述葡萄糖稳态受损是糖尿病前期并且所述对照水平:

i) 代表未患糖尿病前期的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照增加则表示所述受试者患有糖尿病前期或有患糖尿病前期的风险;或

ii) 代表患有糖尿病前期的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照相似或更大则表示所述受试者患有糖尿病前期或有患糖尿病前期的风险。

6. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述葡萄糖稳态受损是妊娠期糖尿病并且所述对照水平:

i) 代表未患妊娠期糖尿病的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照增加则表示所述受试者患有妊娠期糖尿病或有患妊娠期糖尿病的风险;或

ii) 代表患有妊娠期糖尿病的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照相似或更大则表示所述受试者患有妊娠期糖尿病或有患妊娠期糖尿病的风险。

7. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中所述葡萄糖稳态受损是 2 型糖尿病并且所述对照水平:

i) 代表未患 II 型糖尿病的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照增加则表示所述受试者患有 2 型糖尿病或有患 2 型糖尿病的风险;或

ii) 代表患有 II 型糖尿病的受试者中的 CMPF 水平,并且 CMPF 的测试水平相对于所述对照相似或更大则表示所述受试者患有 II 型糖尿病或有患 II 型糖尿病的风险。

8. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中所述对照水平代表具有正常的葡萄糖耐量的受试者中的 CMPF 水平。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其中所述对照水平是预定的标准化的对照水平。

10. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其中所述对照水平是大于 50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$  或 200  $\mu\text{M}$  的血浆 CMPF 水平。

11. 如权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法,其中测定所述样品中 CMPF 的所述测试水平包括检测所述样品中的 CMPF。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用质谱法 (MS),任选地气相色谱 / 质谱法 (GC-MS) 或液相色谱质谱法 (LC-MS)。

13. 如权利要求 11 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用高效液相色谱法 (HPLC) 或核磁共振 (NMR) 光谱法。

14. 如权利要求 11 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用特异性结合 CMPF 的抗体。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

16. 如权利要求 11 至 15 中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在检测 CMPF 之前处理所述样品。

17. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的方法,其中所述样品是血液样品,任选地是血清或血浆。

18. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的方法,其中所述样品是汗液或尿。

19. 如权利要求 1 至 18 中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

20. 一种监测患有葡萄糖稳态受损的受试者的方法,所述方法包括:

(a) 测定来自所述受试者的样品中 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸 (CMPF) 的测试水平;以及

(b) 将 CMPF 的所述测试水平与来自所述受试者在更早的时间点的 CMPF 水平相比较,其中 CMPF 水平增加则表示所述受试者的葡萄糖稳态受损更严重,或 CMPF 水平降低则表示所述受试者的葡萄糖稳态得到改善。

21. 如权利要求 20 所述的方法,所述方法进一步包括在步骤 (a) 之前获得来自所述受试者的样品。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的方法,其中所述葡萄糖稳态受损是  $\beta$ -细胞功能障碍、葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、妊娠期糖尿病、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病。

23. 如权利要求 20 至 22 中任一项所述的方法,其中测定所述样品中 CMPF 的所述测试水平包括检测所述样品中的 CMPF。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用质谱法 (MS),任选地气相色谱 / 质谱法 (GC-MS) 或液相色谱质谱法 (LC-MS)。

25. 如权利要求 23 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用高效液相色谱法 (HPLC) 或核磁共振 (NMR) 光谱法。

26. 如权利要求 23 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用特异性结合 CMPF 的抗体。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其中检测所述样品中的 CMPF 包括使用酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

28. 如权利要求 20 至 27 中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在检测 CMPF 之前

处理所述样品。

29. 如权利要求 20 至 28 中任一项所述的方法,其中所述样品是血液样品,任选地是血清或血浆。

30. 如权利要求 20 至 28 中任一项所述的方法,其中所述样品是汗液或尿。

31. 一种在一个或多个  $\beta$ -细胞中引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法,所述方法包括使所述一个或多个  $\beta$ -细胞与 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 接触。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述  $\beta$ -细胞是胰岛细胞。

33. 如权利要求 31 或 32 所述的方法,其中所述  $\beta$ -细胞在体外、体内或离体。

34. 如权利要求 31 至 33 中任一项所述的方法,所述方法包括使所述  $\beta$ -细胞与大于 50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、150  $\mu$ M 或 200  $\mu$ M 的浓度的 CMPF 接触。

35. 如权利要求 31 或 32 所述的方法,其中所述  $\beta$ -细胞在体外并且使所述  $\beta$ -细胞与 CMPF 接触引起胰岛素分泌受损。

36. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述  $\beta$ -细胞在受试者体内,并且所述方法包括向所述受试者施用 CMPF。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述受试者是动物,如小鼠或大鼠。

38. 如权利要求 37 所述的方法,所述方法包括向所述动物施用至少 5mg/kg 的 CMPF。

39. 如权利要求 36 至 38 中任一项所述的方法,所述方法进一步包括使用所述动物作为特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的动物模型。

40. 如权利要求 31 至 39 中任一项所述的方法,其中所述  $\beta$ -细胞功能障碍包括葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、妊娠期糖尿病、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病。

41. 一种对影响  $\beta$ -细胞活性的药剂进行筛选的方法,所述方法包括:

(a) 提供一个或多个  $\beta$ -细胞,其中所述  $\beta$ -细胞的活性已通过使所述  $\beta$ -细胞与 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 接触而降低;

(b) 使所述  $\beta$ -细胞与测试药剂接触;以及

(c) 确定所述测试药剂对所述  $\beta$ -细胞活性的作用。

42. 如权利要求 41 所述的方法,所述方法进一步包括如果所述测试药剂对所述  $\beta$ -细胞的活性的作用高于阈值水平,那么将所述测试药剂鉴定为有效的。

43. 如权利要求 41 或 42 所述的方法,其中所述活性是葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS)。

44. 如权利要求 41 或 42 所述的方法,其中所述活性是直接地或间接地影响胰岛素转录、胰岛素翻译、胰岛素生物合成和 / 或分泌 (胞吐) 的一种或多种基因、胰岛素调节基因或葡萄糖感应基因的转录或翻译。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中步骤 (c) 包括测定所述一种或多种基因的表达。

46. 如权利要求 44 或 45 所述的方法,其中所述基因选自 SLC2A1、SLC2A2、GCK、Kir6. 2、ABCC8、CACNA1D、CACNA1A、CACNA1H、KCNB1、SNAP25、STX1A、VAMP2、SYN1A、PDX1、MAFA、NKX6. 1、INS (在小鼠中为 INS1 或 INS2)、PCSK1、PCSK2 以及 CPE。

47. 如权利要求 44 或 45 所述的方法,其中所述基因是 GLUT2 或 GCK。

48. 如权利要求 41 或 42 所述的方法,其中所述活性是  $\beta$ -细胞群扩增。

49. 如权利要求 48 所述的方法,其中通过 Brdu 和 / 或 Ki67 测定或使用流式细胞术来

测定  $\beta$ -细胞群扩增。

50. 如权利要求 41 或 42 所述的方法,其中所述活性是  $\beta$ -细胞损失。

51. 如权利要求 50 所述的方法,其中通过膜联蛋白 5-碘化丙锭染色来测定  $\beta$ -细胞损失。

52. 如权利要求 41 至 51 中任一项所述的方法,其中所述  $\beta$ -细胞是胰岛细胞。

53. 如权利要求 41 至 52 中任一项所述的方法,其中所述  $\beta$ -细胞在体外、体内或离体。

54. 如权利要求 41 至 53 中任一项所述的方法,其中影响所述  $\beta$ -细胞活性的所述测试药剂被鉴定为用于治疗特征在于葡萄糖稳态受损的病况的候选者,所述病况如  $\beta$ -细胞功能障碍、葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、胰岛素抵抗、妊娠期糖尿病或 2 型糖尿病。

55. 一种治疗有需要的受试者中  $\beta$ -细胞功能障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 抑制剂。

56. 如权利要求 55 所述的方法,其中所述受试者患有或疑似患有葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、胰岛素抵抗、妊娠期糖尿病或 2 型糖尿病。

57. 如权利要求 55 或 56 所述的方法,其中所述 CMPF 抑制剂是有机阴离子转运蛋白 (OAT) 1、OAT3 和 / 或 OAT4 的调节剂。

58. 如权利要求 55 至 57 中任一项所述的方法,其中所述 CMPF 抑制剂是丙磺舒、对氨基马尿酸盐 (PAH)、苜青霉素 (PCG) 或其组合。

59. 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 抑制剂用于治疗有需要的受试者中  $\beta$ -细胞功能障碍的用途。

60. 如权利要求 59 所述的用途,其中所述受试者患有或疑似患有葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、胰岛素抵抗、妊娠期糖尿病或 2 型糖尿病。

61. 如权利要求 59 或 60 所述的用途,其中所述 CMPF 抑制剂是有机阴离子转运蛋白 (OAT) 1、OAT3 或 OAT4 的调节剂。

62. 如权利要求 59 至 61 中任一项所述的用途,其中所述 CMPF 抑制剂是丙磺舒、对氨基马尿酸盐 (PAH)、苜青霉素 (PCG) 或其组合。

## 作为糖尿病的生物标志物的 CMPF 和相关方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2012 年 9 月 21 日提交的美国临时专利申请号 61/703,867 和 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时专利申请号 61/787,718 的优先权,这两件美国临时专利申请的内容在此以引用的方式整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及糖尿病领域,并且更确切地说,涉及作为患有葡萄糖稳态受损和 / 或糖尿病或有患葡萄糖稳态受损和 / 或糖尿病风险的受试者的生物标志物的 3- 羧基 -4- 甲基 -5- 丙基 -2- 咪喃丙酸 (CMPF)。

### 背景技术

[0004] 日益上升的肥胖率、愈加久坐的生活方式以及人口老龄化持续驱使 2 型糖尿病 (T2D) 患病率的显著增加。在世界范围内估计有 26000 万人患 T2D,数百万人患有糖尿病前期,所述糖尿病前期是一种使个体有更高的患 T2D 风险的葡萄糖耐量受损 (IGT) 的病况,并且每年有另外 700 万人被新诊断出。虽然肥胖和胰岛素抵抗促成 T2D 的发生,但是导致疾病发生的最终是  $\beta$  细胞不能响应于变化的代谢需求。

[0005] 重要的是,另一种形式的糖尿病,即妊娠期糖尿病 (GDM) 的出现也日益增多。目前 3% -14% 的孕妇患有 GDM 并且 GDM 是没有先前糖尿病病史的女性在妊娠晚期期间存在严重的胰岛素抵抗时表现出 IGT 的一种病况。这种严重的获得性胰岛素抵抗对  $\beta$  细胞代偿能力施加了显著的生理应激,与在 T2D 中所观测到的相似,其中适当的适应会产生正常的葡萄糖耐量 (NGT),这表示未来 T2D 的风险低,而不足的  $\beta$  细胞代偿作用导致 GDM,这表明非常高的未来患 T2D 的风险 (在 5 年内约 20% -50%)。

[0006] 当前对 T2D 的诊断测试依靠对血糖水平的直接测量和间接测量。对糖化血红蛋白 (HbA1c) 的测量间接地指示了在先前 2-3 个月内平均的血糖水平,其中 >6.5% 的糖化血红蛋白则表示平均血糖高并且因此表示 T2D。更直接的方法包括随机或空腹血糖测试、或口服葡萄糖耐量测试 (OGTT),如在 GDM 诊断中所使用,其直接测量在摄入后的设定的一段时间内从血液中清除葡萄糖的能力。

[0007] 仍需要用于鉴定和 / 或监测患有葡萄糖稳态受损和 / 或糖尿病的受试者的新的并且改进的方法。

### 发明内容

[0008] 在本公开的一个方面,CMPF 已经被鉴定为葡萄糖稳态受损和 / 或糖尿病的生物标志物。在一个实施方案中,CMPF 是 II 型糖尿病的生物标志物。CMPF 还已经被鉴定为特征在于葡萄糖稳态受损的病况的生物标志物,所述病况诸如但不限于妊娠期糖尿病和葡萄糖耐量受损。CMPF 还已被证实在患有 II 型糖尿病的受试者体内相对于正常对照增加。高水平的 CMPF 还已被证实在体外和体内会损伤  $\beta$  - 细胞功能并且阻止葡萄糖刺激的胰岛素分

泌。

[0009] 在一个实施方案中,提供了一种鉴定患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者的方法,所述方法包括:

[0010] (a) 测定来自受试者的样品中 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 的测试水平;以及

[0011] (b) 将 CMPF 的测试水平与对照水平比较,其中 CMPF 的测试水平相对于对照水平存在差异或相似则表示所述受试者患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损的风险。

[0012] 在一个实施方案中,所述对照水平代表没有葡萄糖稳态受损的受试者的 CMPF 水平并且相对于对照增加的 CMPF 的测试水平则表示所述受试者患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损的风险。在一个实施方案中,所述对照水平代表患有葡萄糖稳态受损的受试者的 CMPF 水平并且相对于对照相似或更大的 CMPF 的测试水平则表示所述受试者患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损的风险。任选地,所述方法进一步包括对被鉴定为患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者进行治疗。举例来说,在一个实施方案中,用 CMPF 抑制剂对被鉴定为患有葡萄糖稳态受损的受试者进行治疗。在一个实施方案中,用胰岛素对所述受试者进行治疗。在一个实施方案中,用二甲双胍 (metformin)、GLP-1 受体激动剂、GLP-1 类似物、磺酰脲 (sulfonylurea) 或胰岛素增敏剂对所述受试者进行治疗。在一些实施方案中,对受试者进行治疗包括向所述受试者施用适用于治疗葡萄糖稳态受损的药剂,如 CMPF 抑制剂、胰岛素、二甲双胍、GLP-1 受体激动剂、GLP-1 类似物、磺酰脲或胰岛素增敏剂等。

[0013] 在另一个实施方案中,提供了一种监测患有葡萄糖稳态受损的受试者的方法,所述方法包括:

[0014] (a) 测定来自所述受试者的样品中 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 的测试水平;以及

[0015] (b) 将 CMPF 的测试水平与来自所述受试者在更早的时间点的 CMPF 水平相比较,其中 CMPF 水平增加则表示所述受试者的葡萄糖稳态受损更严重,或 CMPF 水平降低则表示所述受试者的葡萄糖稳态得到改善。

[0016] 在一个实施方案中,本文所述的用于鉴定或监测患有葡萄糖稳态受损的受试者的方法包括在测定 CMPF 的测试水平之前获得或提供来自所述受试者的样品。在一个实施方案中,患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者患有特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况或有患所述病况的风险。在一个实施方案中,特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况是葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、妊娠期糖尿病、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病。任选地,测定所述样品中 CMPF 的测试水平的步骤包括检测所述样品中的 CMPF。举例来说,在一个实施方案中,使用质谱法、光谱法或免疫组织化学来检测所述样品中的 CMPF。在一个实施方案中,如在酶联免疫吸附测定中,使用对 CMPF 具有特异性的抗体来检测 CMPF。在一个实施方案中,使用气相色谱/质谱法 (GC-MS) 或液相色谱/质谱法 (LC-MS) 来检测 CMPF。

[0017] 在另一个实施方案中,提供了一种在一个或多个  $\beta$ -细胞中引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法,所述方法包括使所述一个或多个  $\beta$ -细胞与 CMPF 接触。任选地,所述  $\beta$ -细胞在体内、体外或离体。在一个实施方案中,使  $\beta$ -细胞与 CMPF 接触引起了胰岛素分泌受损。在一个实施方案中,所述方法包括使所述细胞与大于 20  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、150  $\mu$ M、200  $\mu$ M、

300  $\mu$ M 或 500  $\mu$ M 的浓度的 CMPF 接触。任选地,所述  $\beta$ -细胞在受试者体内并且所述方法包括向所述受试者施用 CMPF。在一个实施方案中,所述受试者是动物,如小鼠或大鼠。任选地,本文所述的引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法可用于产生  $\beta$ -细胞功能障碍的体外或体内模型。在一些实施方案中,这些模型可用于筛选测试药剂以鉴定可用于治疗与葡萄糖稳态受损或  $\beta$ -细胞功能障碍相关的病况的候选者。

[0018] 在一个实施方案中,提供了一种对影响  $\beta$ -细胞活性的药剂进行筛选的方法,所述方法包括:

[0019] (a) 提供一个或多个  $\beta$ -细胞,其中所述  $\beta$ -细胞的活性已通过使所述  $\beta$ -细胞与 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪唑丙酸 (CMPF) 接触而降低;

[0020] (b) 使所述  $\beta$ -细胞与测试药剂接触;以及

[0021] (c) 确定所述测试药剂对所述  $\beta$ -细胞活性的作用。

[0022] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括如果所述测试药剂对所述  $\beta$ -细胞活性的作用高于阈值水平,那么将所述测试药剂鉴定为有效的。在一个实施方案中,所述活性是胰岛素分泌。在一个实施方案中,所述活性是胰岛素胞吐。在一个实施方案中,所述活性是葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS)。在一个实施方案中,所述活性是脂肪酸或氨基酸刺激的胰岛素分泌。在一个实施方案中,所述活性是如由肠促胰岛素激素所调节的胰岛素分泌。在一个实施方案中,所述活性是控制胰岛素生物合成和/或分泌(胞吐)的基因、胰岛素调节基因或葡萄糖感应基因的转录或翻译。在一个实施方案中,所述活性是一种或多种直接地或间接地影响胰岛素转录、胰岛素翻译、胰岛素生物合成和/或分泌(胞吐)的基因、胰岛素调节基因或葡萄糖感应基因的转录或翻译。在一个实施方案中,所述一种或多种基因选自 SLC2A1、SLC2A2、GCK、Kir6. 2、ABCC8、CACNA1D、CACNA1A、CACNA1H、KCNB1、SNAP25、STX1A、VAMP2、SYN1A、PDX1、MAFA、NKX6. 1、INS(小鼠中为 INS1 或 INS2)、PCSK1、PCSK2 以及 CPE。在一个实施方案中,所述活性是  $\beta$ -细胞群扩增或  $\beta$ -细胞损失。任选地,将影响  $\beta$ -细胞活性的测试药剂鉴定为可用于治疗特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的候选者。

[0023] 在另一个实施方案中,提供了一种治疗有需要的受试者的  $\beta$ -细胞功能障碍的方法,所述方法包括向所述受试者施用 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪唑丙酸 (CMPF) 抑制剂。在一个实施方案中,还提供了 CMPF 抑制剂用于治疗有需要的受试者的  $\beta$ -细胞功能障碍的用途。在一个实施方案中,还提供了一种 CMPF 抑制剂,用于治疗有需要的受试者的  $\beta$ -细胞功能障碍。还提供了 CMPF 抑制剂在制备用于治疗  $\beta$ -细胞功能障碍的药物的用途。任选地,所述受试者患有或疑似患有葡萄糖稳态受损、葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、胰岛素抵抗、妊娠期糖尿病或 2 型糖尿病。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂是 OAT 抑制剂。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂是 OAT 激活剂。

[0024] 在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂使血液中 CMPF 的生理浓度降低。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂使胰岛细胞中 CMPF 的生理浓度降低。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂使诸如  $\beta$ -细胞的胰岛产生型细胞中 CMPF 的生理浓度降低。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂是 OAT 调节剂。在一个实施方案中,所述 OAT 调节剂是 OAT1、OAT3 和/或 OAT4 的抑制剂。OAT 特异性抑制剂的实例包括但不限于丙磺舒 (probenecid)、对氨基马尿酸盐 (PAH)、普伐他汀 (pravastatin)、新生霉素 (novobiocin)、磺吡酮 (sulfonpyrazone)、以及苄青霉素 (benzylpenicillin)/青霉素 G (Penicillin G, PCG)、西

司他丁 (cilastatin) 以及 KW-3902。在一个实施方案中,所述 OAT 抑制剂是非特异性 OAT 抑制剂,如丙磺舒。在一个实施方案中,所述 OAT 抑制剂对 OAT1 具有特异性,如 PAH。在一个实施方案中,所述 OAT 抑制剂对 OAT3 具有特异性,如 PCG 或普伐他汀。

[0025] 根据以下详细说明,本发明的其它特征和优势将变得显而易见。然而,应当了解的是,虽然详细说明和具体实施例表明了本发明的优选的实施方案,但是所述详细说明和所述具体实施例仅是以说明的方式给出的,这是因为根据这一详细说明,落入本发明的精神和范围内的各种变化方案和改动方案对于本领域技术人员来说将变得显而易见。

#### 附图说明

[0026] 图 1 :A) 示出了基于代谢组谱分析相比于 NGT 患者血浆在 GDM 患者血浆中显著变化的生物分子的变化倍数的直方图。相比于 NGT,在 GDM 中 CMPF 是最高程度上调的,增加到 5.69 倍。B) 对独特的群组进行两次独立的代谢组学筛选的结果,所述结果显示与 NGT 患者相比,在 GDM 患者中 CMPF 的增加倍数相似。第一轮以黑色示出,第二轮以白色示出,两轮的平均值以灰色示出。与对应的 NGT 群体相比,GDM 值均显著升高,\* $P < 0.01$ 。

[0027] 图 2 示出了 ELISA 结果,所述 ELISA 结果显示相比于 NGT 患者,在妊娠期间获得的 GDM 患者的血浆样品中 CMPF 的水平显著升高;相比于 NGT 患者,在产后获得的 IGT 患者的血浆样品中 CMPF 的水平显著升高;以及相比于 NGT 对照,在混合性别的群体中 T2D 患者的血浆样品中 CMPF 的水平显著升高。GDM-妊娠患者 ( $N = 24$ ) 的 CMPF 血浆浓度是 NGT-妊娠对照 ( $N = 24$ ) 的约 10 倍, $p < 0.001$ 。在产后一年时取自相同孕妇的血浆样品显示患有 GDM 并且在产后进而产生 IGT 的女性 ( $N = 5$ ) 的血浆 CMPF 与在妊娠期间和产后均维持 NGT 的女性 ( $N = 5$ ) 相比增加到 13 倍。来自 T2D 的混合性别群体 ( $N = 6$ ) 的血浆样品显示与 NGT 对照群体 ( $N = 6$ ) 相比,血浆 CMPF 增加到约 10 倍。在所有情况下, $P < 0.05$ ,并且样品在年龄、种族、性别以及妊娠前 BMI 的方面是匹配的。对于妊娠期样品和产后样品来说,患者在糖尿病家族史方面也是匹配的。

[0028] 图 3 示出了 CMPF 显著损伤 MIN6 细胞和完整的原代人和鼠胰岛中的 GSIS。A) 使用媒介物 (0CMPF, 黑色) 或  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF (白色) 对 MIN6 细胞进行处理,证实了 CMPF 处理在 4 小时的预孵育之后显著地损伤 GSIS 和 KCl 刺激的胰岛素分泌 ( $n = 4$ )。使用媒介物 (0CMPF, 黑色)、 $20 \mu\text{M}$  的 CMPF (灰色)、或  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF (白色) 对原代人 (B) 胰岛和原代鼠 (C) 胰岛进行处理证实了与媒介物对照和  $20 \mu\text{M}$  CMPF 对照相比, $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 在 24 小时预孵育之后损伤人胰岛和鼠胰岛这两者中的 GSIS (对于人胰岛,  $n = 5$ , 并且对于鼠胰岛,  $n = 4$ )。LG =  $2.8\text{mM}$  的葡萄糖, HG =  $16.7\text{mM}$  的葡萄糖, KCl =  $16.7\text{mM}$  的葡萄糖 +  $30\text{mM}$  的 KCl。\* $p < 0.05$ 。

[0029] 图 4 示出了 CMPF 处理虽然抑制 GSIS 但是不诱导体外处理的细胞发生细胞凋亡或坏死。A) 使用  $0 \mu\text{M}$  (EtOH 媒介物对照)、 $20 \mu\text{M}$  或  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 将 MIN6 细胞处理 4 小时,之后加入膜联蛋白 V 和碘化丙锭荧光染料,并且使用赫斯特染料 (Hoechst dye) 进行复染色。仅在阳性对照,即接受  $5\text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 3 小时的 MIN6 中观测到膜联蛋白 V 和碘化丙锭染色。B) 将原代 CD1 胰岛分散并且用媒介物对照 (0CMPF, 黑色)、 $20 \mu\text{M}$  的 CMPF (灰色) 或  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF (白色) 处理 48 小时,然后使用膜联蛋白 V、碘化丙锭以及赫斯特染料染色。通过 Arrayscan VTI HCS 读数器对双重阳性染色的定量进行评估。

[0030] 图 5 示出了 CMPF 处理降低了总胰岛素含量和与胰岛素生物合成和葡萄糖感应相关的基因的表达。使用媒介物对照 (0CMPF)、20  $\mu$ M (20CMPF)、或 200  $\mu$ M (200CMPF) CMPF 将鼠胰岛处理 24 小时,并且对总胰岛素含量和 mRNA 表达进行评估。与媒介物对照相比,200  $\mu$ M 的 CMPF 显著地降低了总胰岛素含量 (A) 和胰岛素 mRNA (B)。胰岛素 mRNA 的表达减少可能是因为包括 Pdx-1、MafA 以及 HNF4a 在内的胰岛素转录因子的表达减少 (C)。胰岛素加工酶 PCSK1、PCSK2 以及 CpE 的表达减少 (D) 表示 CMPF 还可以损伤翻译后的胰岛素加工。最终, CMPF 引起  $\beta$  细胞葡萄糖转运蛋白 GLUT2 和对于葡萄糖代谢来说关键的限速酶 GCK 的表达减少 (E),这或许损伤了葡萄糖感应和代谢。在所有情况下,  $n = 4$ , \* $P < 0.05$ 。

[0031] 图 6 示出了腹膜内注射 CMPF 使得血浆水平升高并且在腹膜内注射 3 天后进行的 OGTT 显示在接受 CMPF 处理的小鼠中胰岛素分泌受损以及葡萄糖耐量受损。对 CD1 小鼠腹膜内注射媒介物对照 (黑色) 或 CMPF (白色)。A) 在腹膜内注射后的 10 分钟、30 分钟、60 分钟、120 分钟以及 360 分钟时获得血浆样品,并且对 CMPF 进行测定。接受 CMPF 注射的小鼠的血浆 CMPF 的水平显著地升高 ( $p < 0.05$ ) 持续最多 2 小时,但在注射后的 6 小时之时不显著升高 (每组  $n = 4$ )。在腹膜内注射的 3 天过程期间,监测小鼠的体重 (B)、随机进食血糖 (C) 以及血浆胰岛素 (C)。这些参数中的任一个均不存在差异。在连续 3 天的 CMPF 注射之后,使小鼠禁食 14 小时,并且进行 OGTT。接受 CMPF 处理的小鼠与接受媒介物注射的对照相比具有显著受损的胰岛素分泌 (D) 和受损的葡萄糖耐量 (C) (每组  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ )。

[0032] 图 7 示出了取自接受 CMPF 腹膜内注射 3 天的小鼠的胰岛显示 GSIS 受损,总胰岛素含量减少以及胰岛素 mRNA 减少。A) 在接受 CMPF 注射的小鼠 (处理,白色) 与媒介物对照 (对照,黑色) 之间在胰岛尺寸方面不存在显著性差异。这些胰岛确实表现出 GSIS 受损 (B)、总胰岛素含量减少 (C) 以及胰岛素 mRNA 减少 (D),与对分离的原代胰岛进行体外处理相一致。  $N = 5$ , \* $P < 0.05$ 。

[0033] 图 8 示出了 CMPF 可以引起胰岛素抵抗并且在腹膜内注射 7 天后进行的 OGTT 显示在接受 CMPF 处理的小鼠中胰岛素分泌受损以及葡萄糖耐量受损。对 CD1 小鼠腹膜内注射媒介物对照 (黑色) 或 CMPF (白色)。在腹膜内注射的 7 天过程期间,监测小鼠的体重 (A) 以及随机进食血糖 (B) 和血浆胰岛素 (C)。体重或血糖不存在差异,然而,接受 CMPF 处理的小鼠在注射的第 4-7 天具有显著升高的血浆胰岛素水平,这表示 CMPF 促使胰岛素抵抗。在第 8 天,在 14 小时禁食之后,在即将进行 OGTT 之前出现较低体重。在连续 7 天的 CMPF 注射之后,使小鼠禁食 14 小时,并且进行 OGTT。接受 CMPF 处理的小鼠与对照相比具有显著受损的葡萄糖耐量 (D),这对应于显著受损的胰岛素分泌 (E)。在 OGTT 后立即从小鼠分离的胰岛显示相对于对照,在接受 CMPF 注射的小鼠中,在低葡萄糖下胰岛素的分泌显著增加以及在高葡萄糖下胰岛素的分泌显著减少 (F)。(每组  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ )。

[0034] 图 9 示出了 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪唑丙酸 (CMPF) 的结构和分子式。CMPF 在健康的个体体内以 20  $\mu$ M 的浓度内源性地存在,而在尿毒症个体体内以超过 200  $\mu$ M 的浓度内源性地存在。

[0035] 图 10 示出了在 24 小时处理之后, CMPF 损伤  $\beta$  细胞的功能。接受 200  $\mu$ M 的 CMPF 处理 24 小时的 CD1 小鼠胰岛与接受媒介物处理的对照相比具有显著受损的葡萄糖刺激的胰岛素分泌和 KCl 刺激的胰岛素分泌。

[0036] 图 11 示出了 OAT1 和 OAT3 在 CMPF 转运入肾脏中起作用,而 OAT4 负责向肾管腔内

的分泌。OAT1 和 OAT3 充当交换因子,将 CMPF 从血浆吸收到肾脏的近端小管细胞中并且将二羧酸释放到血液中。协同转运蛋白 NaDC3 通过将二羧酸和钠离子这两者转运到细胞中来补充细胞中的二羧酸。一旦 CMPF 处在小管细胞中,它就由 OAT4 排泄到肾管腔中与氯离子进行交换。

[0037] 图 12 示出了丙磺舒在体内阻断 OAT 转运蛋白的功能。图 (A) 改写自 Costigan 等, 1996 并且示出了在单独施用 5mg/kg 时, CMPF 从血浆中被清除 (淡灰色)。在将 CMPF 与 150mg/kg 丙磺舒共同施用,它的清除率随时间推移显著降低。图 (B) 示出了对小鼠每天两次注射 150mg/kg 的丙磺舒抑制了 OAT 转运蛋白的功能,如通过显著降低的血浆尿酸浓度所证实。

[0038] 图 13 示出了 OAT 转运蛋白和协同转运蛋白在胰岛细胞中表达。在图 (A) 中, OAT1、OAT3 以及 NaDC3 在小鼠胰岛中以与其它胰岛基因相当的水平表达。图 (B) 示出了 OAT3 和 NaDC3 主要在胰岛素产生型细胞中表达,而 OAT1 和 OAT4 主要在非胰岛素产生型人胰岛细胞中表达。C) OAT1、OAT3 以及 NaDC3 在人胰岛中的表达由蛋白质印迹法 (Western blotting) 确认。使用人近端小管细胞系 HK-2 作为阳性对照。

[0039] 图 14 示出了抑制 OAT 转运蛋白阻断了 CMPF 对  $\beta$  细胞功能的抑制作用。图 (A) 示出了在分离的小鼠胰岛中使用 1mM 丙磺舒对胰岛进行预处理,之后使用 200  $\mu$ M 的 CMPF 处理 24 小时保持了胰岛素的分泌。图 (B) 示出了在分离的小鼠胰岛中使用 300  $\mu$ M 的 OAT3 特异性阻断剂 PCG 对胰岛进行预处理,之后使用 200  $\mu$ M 的 CMPF 处理 24 小时保持了葡萄糖刺激的胰岛素分泌。

[0040] 图 15 示出了丙磺舒在体内对葡萄糖耐量没有影响。接受 3 天的 150mg/kg 丙磺舒每天两次注射的小鼠在 (A) 体重或 (B) 血糖方面没有差异。图 (C) 示出了在第 4 天进行 OGTT 并且在媒介物对照与接受丙磺舒注射的小鼠之间葡萄糖耐量未显示出差异。

[0041] 图 16 示出了在注射 CMPF 7 天之后,基于高胰岛素 - 正常血糖钳夹,小鼠具有降低的葡萄糖利用。A) 图示了注射和手术的时间线的示意图。与媒介物对照相比,接受 7 天的 CMPF 注射的小鼠的 B) 葡萄糖输注率、(C) 葡萄糖出现率和 (D) 葡萄糖消失率以及 (E) 糖酵解率 (每组  $N = 4$ )。后期 / 基础的糖酵解率无差异,表明 CMPF 没有诱发胰岛素抵抗,而是降低了葡萄糖出现率和葡萄糖消失率。\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 。值是平均值  $\pm$  SEM。

[0042] 图 17 示出了 CMPF 由  $\beta$  - 细胞代谢以增加 ROS 并且改变胰岛素的生物合成。A) 被处理 24 小时的胰岛基质中的胰岛素原 (每组  $n = 4$ )。B) 在急速添加媒介物对照或 200  $\mu$ M 的 CMPF 之后的线粒体膜电位 (MMP) (每组  $N = 3$ )。C) 在被处理 4 小时和被处理 24 小时的小鼠胰岛中的 ROS 水平以及代表性的图像 ( $N =$  来自 4 只小鼠 / 组的 10-15 个胰岛 / 小鼠)。D) 抗氧化基因 Cat 和 (e) Ucp2 的表达 (每组  $n = 4$ )。F) 在接受 500  $\mu$ M 的 NAC 处理的被处理 24 小时的胰岛中的 ROS 积聚 ( $n =$  来自 4 只小鼠 / 组的 10 个胰岛 / 小鼠)。接受 500  $\mu$ M 的 NAC 共同处理的被处理 24 小时的胰岛的 G) GSIS 和 (h) 总胰岛素含量 (每组  $n = 4$ )。示出了 (i) GSK3  $\beta$  的 Ser9 磷酸化、(j) AKT 的 Ser473 磷酸化的蛋白质印迹 (每组  $n = 3$ )。K) 示出了在使用 CMPF 和 NAC 处理的情况下 FOXO1 和 (l) PDX1 的核易位的免疫荧光染色 ( $n = 3-6$ )。在使用 CMPF 和 NAC 处理的情况下基于免疫荧光染色 (m) FOXO1 和 (n) PDX1 的核百分比的定量。O) 示出了 PDX1 和 FOXO1 的蛋白质丰度的蛋白质印迹。值是平均值  $\pm$  SEM。学生 t 检验 (Student's t-test) (a, c-j, m-o)、单因素 ANOVA (b)。\* $P < 0.05$ ,

\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。

[0043] 图 18 示出了 CMPF 引起胰岛素生物合成基因的表达减少并且改变代谢基因的表达。A) 在被 24 小时处理的胰岛中胰岛素、胰岛素加工酶、胰岛素转录因子以及葡萄糖感应基因的表达 (每组 N = 5-6)。B) 在与对照或 200  $\mu$ M 的 CMPF 一起孵育 24 小时之后的 MMP 以及荧光的变化 (每组 N = 4)。C) 在被处理 24 小时的小鼠胰岛中通过微阵列基于生物功能对显著变化的基因进行的分类 (N = 3, P<0.05)。值是平均值  $\pm$  SEM。学生 t 检验 (a、c)、单因素 ANOVA (b)。\*P<0.05, \*\*P<0.01。

[0044] 图 19 示出了 CMPF 经由有机阴离子转运蛋白 3 进入  $\beta$ -细胞。A) 对显示 OAT 转运蛋白和  $\beta$ -细胞基因表达的人胰岛的微阵列分析 (n = 3)。通过 (b) RT-PCR、(c) 蛋白质印迹、以及 (d) 使用胰岛素进行的免疫荧光染色对人胰岛中的 OAT 表达的验证 (n = 3-5)。人肾脏样品来自于 HK2 人近端小管细胞系。接受 OAT 抑制剂 (e) 丙磺舒、(f) 芑青霉素 (PCG) 以及 (g) 对氨基马尿酸盐 (PAH) 共同处理的鼠胰岛的 GSIS (每组 n = 4)。h) 接受 CMPF 和 PCG 共同处理的鼠胰岛的总胰岛素含量 (n = 4)。值是平均值  $\pm$  SEM。学生 t 检验 (a、e-h)。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。

[0045] 图 20 示出了使 CMPF 与无脂肪酸的 BSA 缀合对受 CMPF 损伤的葡萄糖刺激的胰岛素分泌没有影响。使 CMPF 与无脂肪酸的 BSA 缀合 6 小时, 之后添加胰岛 (绿色条柱和蓝色条柱)。使用用于缀合油酸酯的相同的方案。黑色条柱和白色条柱表示在未进行预先缀合的情况下在培养基中添加 CMPF 连同 0.1% 的 BSA。N = 3。\*P<0.05。

### 具体实施方式

[0046] 在本发明说明内容的一个方面, 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 已被证实是一种可用于鉴定患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者的生物标志物。如在实施例 1 中所阐述, 发现与具有正常的葡萄糖耐量的受试者相比, 咪喃脂肪酸 CMPF 的水平在患有妊娠期糖尿病 (GDM) 的受试者中升高。还发现在 GDM 后在产后 1 年内患葡萄糖耐量受损的女性与在同一时间段内维持正常的葡萄糖耐量的女性相比具有显著升高的 CMPF 水平。在本公开的另一个方面, 高的生理学上相关水平的 CMPF 已经被证实会在体外会损伤胰岛素分泌。此外, 注射 CMPF 已经被证实在体内会损伤  $\beta$ -细胞功能并且阻止葡萄糖刺激的胰岛素分泌。CMPF 因此损伤了葡萄糖利用, 如通过葡萄糖耐量测试所测量, 并且与葡萄糖稳态受损和特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的发病有关, 所述病况如 GDM、胰岛素分泌受损、葡萄糖不耐症以及 II 型糖尿病。诸如丙磺舒之类的 CMPF 抑制剂的使用已经被证实会消除 CMPF 对葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响。值得注意的是, 丙磺舒的施用还已经被证实会升高体内的循环 CMPF 水平而不改变葡萄糖耐量。降低血液和 / 或胰岛细胞中 CMPF 的生理水平的 CMPF 抑制剂因此预期可用于治疗如患有葡萄糖稳态受损的受试者的  $\beta$ -细胞功能障碍。

[0047] 本发明的说明内容因此提供了用于鉴定患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者的方法以及用于监测患有葡萄糖稳态受损的受试者的方法。任选地, 患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者患有  $\beta$ -细胞功能障碍或特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况。任选地, 本文所述的方法可用于鉴定或监测患有葡萄糖稳态受损而未患  $\beta$ -细胞功能障碍的受试者。

[0048] 还提供了用于通过使一个或多个细胞与 CMPF 接触来引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法。用于引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法可用于产生葡萄糖稳态受损和特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的体外模型或体内模型。本公开还提供了对影响  $\beta$ -细胞活性的化合物进行筛选的方法。还提供了用于治疗  $\beta$ -细胞功能障碍或特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的方法,所述方法包括向受试者施用 CMPF 抑制剂;或 CMPF 抑制剂用于治疗  $\beta$ -细胞功能障碍或特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的用途。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂是 OAT 激活剂并且使用所述 OAT 激活剂进行治疗有助于降低血液中 CMPF 的水平。任选地,所述 CMPF 抑制剂是 OAT 抑制剂,如丙磺舒、对氨基马尿酸盐 (PAH) 或芑青霉素 (PCG)、或其组合。在一个实施方案中,使用 OAT 抑制剂进行治疗有助于降低胰岛细胞中 CMPF 的水平。

[0049] 定义

[0050] 如本文所用的“葡萄糖稳态受损”指的是其中受试者不能维持血液中正常的葡萄糖水平的一种短暂的或持续的病况。葡萄糖稳态受损的实例包括但不限于胰岛素分泌受损、葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、妊娠期糖尿病、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病。任选地,患有葡萄糖稳态受损的受试者还患有  $\beta$ -细胞功能障碍。

[0051] 如本文所用的术语“ $\beta$ -细胞功能障碍”指的是其中  $\beta$ -细胞的活力或生理活性受损的一种病况。在一个实施方案中, $\beta$ -细胞功能障碍指的是  $\beta$  细胞不能分泌足够的生物活性胰岛素以维持血液和组织中葡萄糖、脂肪酸以及其它营养物质的正常水平。在一个实施方案中, $\beta$ -细胞功能障碍指的是  $\beta$ -细胞的胰岛素分泌被不适当地增大,其促使胰岛素抵抗的发生。 $\beta$ -细胞功能障碍任选地是体外、离体或体内一个或多个细胞的病况。 $\beta$ -细胞功能障碍的实例包括但不限于胰岛素分泌受损、葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、妊娠期糖尿病、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病。

[0052] 如本文所用的术语“受试者”指的是动物界中具有  $\beta$ -细胞的任何成员,所述  $\beta$ -细胞储存并且释放胰岛素以控制血液中葡萄糖的水平。在一个实施方案中,所述受试者是人。在一个实施方案中,所述受试者患有或疑似患有特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况。在一个实施方案中,所述受试者是动物,如大鼠或小鼠。

[0053] 术语“样品”指的是来自受试者的可以测定 CMPF 的任何流体或其它样品。举例来说,在一个实施方案中,所述样品是血液或血液衍生物,如血清或血浆。任选地,所述样品是呈 EDTA (钠盐、K2 盐或 K3 盐) 或肝素形式的血浆。在一个实施方案中,所述样品是尿或汗液。在一个实施方案中,测定来自受试者的测试样品中 CMPF 的水平。任选地,所述测试样品可以是冷冻的样品或存档的样品。

[0054] 如本文所用的术语“对照水平”指的是来自已知患有特定的病况或未患特定的病况的受试者或一组受试者的样品中 CMPF 的水平。所述对照可以变化,这取决于正被监测、评估或鉴定的物质。举例来说,在一个实施方案中,CMPF 的测试水平相对于对照水平存在差异或相似则表示所述受试者患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损的风险。在一个实施方案中,CMPF 的测试水平相对于对照水平存在差异或相似则表示所述受试者患有特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况或有患特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的风险。所述对照还可以是值的预定的标准、平均或参考范围。任选地,术语“对照水平”包括在更早的时间点测定的来自受试者的测试样品中 CMPF 的水平。在一个实施方案中,对照是年龄或性别匹配的对照。在一些实施方案中,对照水平表示受试者未患葡萄糖稳态受损,任选地约  $20 \mu\text{M}$ 。

在一些实施方案中,对照水平表示受试者患有葡萄糖稳态受损,任选地约 50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、150  $\mu$ M 或 200  $\mu$ M。在一些实施方案中,大于对照水平的 CMPF 水平表示受试者患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损的风险。

[0055] 如本文所用的“药剂”指的是具有确定的或未确定的组成的分子、化合物或物质,包括但不限于有机或无机分子、多肽、抗体、多糖或其它生物分子或者由诸如细菌、植物、真菌或动物细胞或组织之类的生物材料制成的提取物。任选地,所述药剂是处在诸如组合的小分子阵列或展示文库之类的阵列中的分子、化合物或物质。在一个实施方案中,所述药剂是有机化合物,如丙磺舒、对氨基马尿酸盐 (PAH) 或芞青霉素 (PCG)。

[0056] 如本文所用的“ $\beta$ -细胞的活性”指的是  $\beta$ -细胞影响对营养物质的感应或胰岛素的合成、储存或释放的尺寸、活力或生理活性方面的任何变化。 $\beta$ -细胞的活性的实例包括但不限于葡萄糖刺激的胰岛素分泌、胰岛素基因或葡萄糖感应基因的转录或翻译、 $\beta$ -细胞数目的变化或  $\beta$ -细胞群的扩增、损耗或扩增失败。任选地,本文所述的方法包括确定测试药剂对一个或多个  $\beta$ -细胞的单一活性或两种或更多种活性的作用。

[0057] 如本文所用的术语“葡萄糖耐量受损”指的是特点在于与胰岛素抵抗有关的高血糖症的糖尿病前期状态的一种病况。术语“胰岛素抵抗”指的是其中胰岛素在降低血糖水平方面变得不太有效的一种生理病况。术语“妊娠期糖尿病”指的是其中先前未被诊断出 2 型糖尿病的女性在妊娠期期间表现出高的血糖水平的一种病况。如本文所用的术语“糖尿病前期”指的是其中受试者表现出空腹血糖受损和 / 或葡萄糖耐量受损而尚未发展成糖尿病或 2 型糖尿病的一种病况。如本文所用的术语“2 型糖尿病”也被称为非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM),是特征在于在胰岛素抵抗和相对胰岛素缺乏的背景下出现高血糖的一种代谢病症。任选地,2 型糖尿病指的是受试者的空腹血浆葡萄糖  $\geq 7.0$  mmol/l (126mg/dl)。用于鉴定患有葡萄糖稳态受损、糖尿病、 $\beta$ -细胞功能障碍和 / 或相关病况的受试者的合适标准参见于 Standards of Medical Care in Diabetes-2012 Diabetes Care (糖尿病的医疗护理标准 -2012 年糖尿病护理),第 35 卷,增刊 1,2012 年 1 月中,该文献在此以引用的方式并入本文。

[0058] 如本文所用的术语“抗体”意图包括单克隆抗体、多克隆抗体以及嵌合抗体。所述抗体可以来自于重组来源和 / 或在转基因动物中产生。如本文所用的术语“抗体片段”意图包括而但不限于 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微型抗体、双特异抗体、以及其多聚体、多特异性抗体片段和结构域抗体。可以使用常规技术使抗体片段化。举例来说,F(ab')<sub>2</sub> 片段可以通过使用胃蛋白酶对抗体进行处理而产生。可以对所得的 F(ab')<sub>2</sub> 片段进行处理以还原二硫桥键而产生 Fab' 片段。木瓜蛋白酶消化可以引起 Fab 片段形成。Fab、Fab' 和 F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微型抗体、双特异抗体、双特异性抗体片段以及其它片段还可以通过重组技术来合成。

[0059] CMPF 的抗体可商购自生命科学先进技术公司 (Life Sciences Advanced Technology Inc.) (佛罗里达州的圣彼得堡 (St. Petersburg, FL)) 或诺威特生物科技公司 (Noventein Biosciences) (马萨诸塞州的剑桥市 (Cambridge, Mass.))。然而,本领域技术人员将了解的是,可以产生对 CMPF 或对与 CMPF 代谢或降解相关的生物标志物具有特异性的其它抗体。为了产生单克隆抗体,可以从利用目标抗原 (例如 CMPF) 免疫接种的动物收集抗体产生细胞 (淋巴细胞) 并且通过标准的体细胞融合程序使这些细胞与骨髓瘤

细胞融合,从而使得这些细胞永生化并且产生杂交瘤细胞。这些技术(例如最初由 Kohler 和 Milstein (Nature 256:495-497 (1975) 研发的杂交瘤技术)以及其它技术是本领域公知的,所述其他技术如人 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等, Immunol. Today 4:72 (1983))、产生人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等, Methods Enzymol, 121:140-67 (1986))、以及对组合抗体文库进行筛选 (Huse 等, Science 246:1275 (1989))。可以免疫化学方式针对与目标抗原发生特异性反应的抗体的产生来筛选杂交瘤细胞,并且可以分离单克隆抗体。

[0060] 如本文所用的术语“CMPF 抑制剂”包括螯合或降低血液或血浆中 CMPF 的生理浓度和 / 或降低胰岛细胞中 CMPF 的生理浓度的任何药剂。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂提高了 CMPF 从血浆中的清除率。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂是 OAT 激活剂。在一个实施方案中,所述 OAT 激活剂提高了 CMPF 从血浆中的清除率。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂降低胰腺  $\beta$ -细胞中 CMPF 的生理浓度。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂抑制在胰岛细胞中表达的有机阴离子转运蛋白 (OAT) 的活性。在一个实施方案中,所述 CMPF 抑制剂是 OAT 抑制剂。

[0061] 如本文所用的“OAT 抑制剂”指的是抑制有机阴离子转运蛋白 (OAT) 的表达或活性的任何药剂。在一个实施方案中,OAT 抑制剂抑制 OAT1 (也被称为 SLC22A6)、OAT3 (也被称为 SLC22A8) 和 / 或 OAT4 (也被称为 SLC22A11) 的表达或活性。OAT 抑制剂的实例包括但不限于丙磺舒、苜蓿霉素 (PCG) 以及对氨基马尿酸盐 (PAH)。

[0062] 如本文所用的“OAT 激活剂”指的是提高有机阴离子转运蛋白 (OAT) 的表达或活性的任何药剂。在一个实施方案中,所述 OAT 激活剂对 OAT4 (也被称为 SLC22A11) 具有特异性。

[0063] 如本文所用的并且如本领域所充分了解的“治疗 (treating 或 treatment)”意指用于获得有益的或所需的结果的方法,所述结果包括临床结果。有益的或所需的临床结果可以包括但不限于减轻或改善一种或多种症状或病况;降低疾病的程度;使疾病的状态稳定(即不恶化)(例如维持足够的胰岛素和 / 或生理学上正常的血糖水平);预防疾病传播;延迟或减缓疾病进展;改善或缓和疾病状态;减少疾病复发;以及缓解(无论是部分缓解还是完全缓解),无论是可检测出的或是不可检出的。“治疗”还可以意指使存活期与在未接受治疗的情况下预期的存活期相比得到延长。如本文所用的“治疗”还包括预防性治疗。在一个实施方案中,治疗方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的 CMPF 抑制剂并且任选地由单次施用组成,或可选地包括一系列施用。在一个实施方案中,“治疗”包括改善具有葡萄糖稳态受损的受试者中的  $\beta$ -细胞功能。

[0064] 如本文所用的短语“有效量”或“治疗有效量”意指在为实现所需的结果所必需的剂量和时间段下有效的量。举例来说,在治疗葡萄糖稳态受损的背景下,有效量是与在未施用化合物的情况下所获得的反应相比[有助于改善  $\beta$ -细胞功能或有助于使胰岛素和 / 或葡萄糖的水平稳定在生理学上正常的浓度]的量。有效量可以根据诸如受试者的疾病状态、年龄、性别以及体重之类的因素而变化。将对应于这种量的给定化合物的量将随各种因素而变化,所述因素如给定的药物或化合物、药物制剂、施用途径、疾病或病症的类型、所治疗的受试者或宿主的特征等,但仍然可以由本领域技术人员常规地确定。

[0065] 在一个实施方案中,诸如本文所述的 CMPF 抑制剂之类的化合物被制备或配制用于向有需要的受试者施用,如本领域已知的那样。用于选择和制备合适的制剂的常规

程序和成分描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》)(2003年-第20版)和1999年出版的 The United States Pharmacopeia:The National Formulary(《美国药典:国家处方集》)(USP24NF19)中。

[0066] 鉴定或监测  $\beta$ -细胞功能障碍的方法

[0067] 在一个实施方案中,提供了一种鉴定患有葡萄糖稳态受损或有产生葡萄糖稳态受损风险的受试者的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:

[0068] a) 测定来自受试者的样品中 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸(CMPF)的测试水平;以及

[0069] (b) 将 CMPF 的测试水平与对照水平比较,其中 CMPF 的测试水平相对于对照水平存在差异或相似则表示所述受试者患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损的风险。

[0070] 还提供了一种监测患有葡萄糖稳态受损的受试者的方法,所述方法包括:

[0071] (a) 测定来自所述受试者的样品中 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸(CMPF)的测试水平;以及

[0072] (b) 将 CMPF 的测试水平与来自所述受试者在更早的时间点的 CMPF 水平相比较,其中 CMPF 水平增加则表示所述受试者的葡萄糖稳态受损更严重,并且 CMPF 水平降低则表示所述受试者的葡萄糖稳态得到改善。

[0073] 在一个实施方案中,本文所述的用于鉴定或监测患有葡萄糖稳态受损的受试者的方法可用于鉴定或监测患有  $\beta$ -细胞功能障碍或有患  $\beta$ -细胞功能障碍风险的受试者。任选地,本文所述的方法包括获得或提供来自所述受试者的样品。举例来说,在一个实施方案中,所述样品是血液样品、血浆样品、血清样品或尿样品或者可以用于分析 CMPF 水平的另一种生物样品。

[0074] 在一个实施方案中,本文所述的方法可用于鉴定或监测其中对血糖水平的调节受损的病况。特征在于葡萄糖稳态受损的病况的实例包括但不限于  $\beta$ -细胞功能障碍、葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、妊娠期糖尿病(GDM)、胰岛素抵抗或2型糖尿病。在一个实施方案中,受试者中 CMPF 水平的量值反映了所述受试者中对血糖水平的调节受损的严重程度。在一个实施方案中,受试者中 CMPF 水平的量值反映了所述受试者中  $\beta$ -细胞功能障碍的严重程度。

[0075] 本领域技术人员将了解的是,在来自受试者的测试样品中所观测到的 CMPF 的水平与对照水平之间的差异或相似可以被用于鉴定或监测患有或疑似患有葡萄糖稳态受损的受试者。

[0076] 举例来说,如果正在对妊娠期糖尿病(GDM)进行鉴定或监测,那么所述对照可以来自于已知未患 GDM 的受试者或一组受试者,并且相对于所述对照,测试受试者的 CMPF 的水平更高则表示所述测试受试者患有 GDM 或患 GDM 的风险增加。任选地,所述对照可以来自于已知患有 GDM 的受试者或一组受试者,并且测试受试者的 CMPF 的水平相对于所述对照相似则表示所述测试受试者患有 GDM 或患 GDM 的风险增加。

[0077] 在一个实施方案中,所述对照来自于已知未患葡萄糖耐量受损的受试者或一组受试者,并且相对于所述对照,测试受试者的 CMPF 的水平更高则表示所述测试受试者患有葡萄糖耐量受损或患葡萄糖耐量受损的风险增加。任选地,所述对照可以来自于已知患有葡萄糖耐量受损的受试者或一组受试者,并且测试受试者的 CMPF 的水平相对于所述对照相

似则表示所述测试受试者患有葡萄糖耐量受损或患葡萄糖耐量受损的风险增加。

[0078] 在一个实施方案中,所述对照来自于已知未患糖尿病前期的受试者或一组受试者,并且相对于所述对照,测试受试者的 CMPF 的水平更高则表示所述测试受试者患有糖尿病前期或患糖尿病前期的风险增加。任选地,所述对照可以来自于已知患有糖尿病前期的受试者或一组受试者,并且测试受试者的 CMPF 的水平相对于所述对照相似则表示所述测试受试者患有葡萄糖耐量受损或患糖尿病前期的风险增加。

[0079] 在一个实施方案中,所述对照来自于已知未患胰岛素抵抗的受试者或一组受试者,并且相对于所述对照,测试受试者的 CMPF 的水平更高则表示所述测试受试者患有胰岛素抵抗或患胰岛素抵抗的风险增加。任选地,所述对照可以来自于已知患有胰岛素抵抗的受试者或一组受试者,并且测试受试者的 CMPF 的水平相对于所述对照相似则表示所述测试受试者患有胰岛素抵抗或患胰岛素抵抗的风险增加。

[0080] 在一个实施方案中,所述对照来自于已知未患 2 型糖尿病的受试者或一组受试者,并且相对于所述对照,测试受试者的 CMPF 的水平更高则表示所述测试受试者患有 2 型糖尿病或患 2 型糖尿病的风险增加。任选地,所述对照可以来自于已知患有 2 型糖尿病的受试者或一组受试者,并且测试受试者的 CMPF 的水平相对于所述对照相似则表示所述测试受试者患有 2 型糖尿病或患 2 型糖尿病的风险增加。

[0081] 在一个实施方案中,所述对照水平代表具有正常的葡萄糖耐量的受试者中的 CMPF 水平,并且相对于所述对照水平,测试样品中 CMPF 的水平增加则表示葡萄糖耐量受损。

[0082] 未患葡萄糖稳态受损的受试者的血浆中 CMPF 的水平一般在约  $10\ \mu\text{M}$  至  $30\ \mu\text{M}$  的范围内,通常是约  $20\ \mu\text{M}$ 。在一个实施方案中,测试受试者的血浆 CMPF 水平显著地高于约  $20\ \mu\text{M}$  则表示葡萄糖稳态受损。在一个实施方案中,血浆中大于  $50\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ 、 $150\ \mu\text{M}$ 、 $200\ \mu\text{M}$ 、 $300\ \mu\text{M}$  或  $500\ \mu\text{M}$  的 CMPF 的水平表示葡萄糖稳态受损。在一个实施方案中,受试者中的 CMPF 水平的量值表示受试者中葡萄糖稳态受损的严重程度。

[0083] 在一个实施方案中,测定样品中 CMPF 的测试水平的步骤包括检测样品中的 CMPF。在一个实施方案中,测定 CMPF 的测试水平的步骤包括检测或测定样品中代表 CMPF 水平的 CMPF 代谢物或分析物的水平。举例来说,在一个实施方案中,本文所述的方法包括检测或测定产生 CMPF 的一种或多种前体分子或 CMPF 代谢或降解的副产物的水平。在一个实施方案中,本文所述的方法包括检测或测定由于 CMPF 的血浆水平增加而具有改变的丰度的诸如甲状腺素(甲状腺激素)之类的一种或多种白蛋白结合型蛋白质/代谢物/肽的水平。CMPF 是高白蛋白结合型并且可以竞争过其它白蛋白结合型蛋白质。(Lim 等, *Metabolism*(1993), 42(11);1468)。因此,血液中升高水平的 CMPF 可以引起诸如甲状腺素之类的其它白蛋白结合型蛋白质被置换,从而增加它们在血液中的游离(非白蛋白结合型)水平。

[0084] 任选地,本文所述的方法包括在检测 CMPF 之前对样品进行处理。举例来说,在一个实施方案中,对样品进行处理以从样品中去除可能会干扰 CMPF 检测的成分和/或分离或纯化样品中的 CMPF。在一个实施方案中,可以使用色谱法对样品进行处理。在一个实施方案中,对样品进行处理以在检测样品中的 CMPF 之前去除高丰度的蛋白质诸如白蛋白。

[0085] 本领域技术人员已知用于检测 CMPF 的不同的方法可用于本文所述的方法的目的。举例来说,在一个实施方案中,使用质谱法(MS),任选地气相色谱/质谱法(GC-MS)或

液相色谱 / 质谱法 (LC-MS) 来检测 CMPF。在一个实施方案中,检测 CMPF 的步骤包括使用高效液相色谱法 (HPLC) 或核磁共振 (NMR) 光谱法。

[0086] 在一个实施方案中,免疫组织化学方法可用于检测 CMPF。举例来说, CMPF 容易使用特异性结合 CMPF 的抗体来检测。在一个实施方案中,使用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 对 CMPF 进行检测。对有助于检测的抗体进行标记的任何方法均将是有益的 (例如放射性标记的肽、酶或荧光标记的肽)。可用于检测 CMPF 的其它测定可以包括但不限于:放射免疫测定、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、“夹心”测定、沉淀素反应、凝胶扩散免疫扩散测定、凝集测定、荧光免疫测定以及免疫电泳测定。

[0087] 引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法

[0088] 在本公开的一个方面,高于正常水平的 CMPF 已经被证实会引起  $\beta$ -细胞功能障碍。因此,在一个实施方案中,提供了一种在一个或多个  $\beta$ -细胞中引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法,所述方法包括使一个或多个  $\beta$ -细胞与 CMPF 接触。任选地,所述  $\beta$ -细胞是胰岛细胞。在一个实施方案中,所述  $\beta$ -细胞在体外、体内或离体。本文所述的用于引起  $\beta$ -细胞功能障碍的方法可用于产生特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况 (如糖尿病) 的体外、体内或离体模型。

[0089] 在一个实施方案中,使  $\beta$ -细胞与超生理浓度的 CMPF 接触将引起  $\beta$ -细胞功能障碍。举例来说,在一个实施方案中,使  $\beta$ -细胞与大于  $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $150 \mu\text{M}$ 、 $200 \mu\text{M}$ 、 $300 \mu\text{M}$  或  $500 \mu\text{M}$  的浓度的 CMPF 接触。本领域技术人员将了解的是, CMPF 的浓度越大,在  $\beta$ -细胞中所引起的功能障碍就越大。

[0090] 在一个实施方案中,所述  $\beta$ -细胞在体外并且使所述  $\beta$ -细胞与 CMPF 接触引起了胰岛素分泌受损。或者,所述  $\beta$ -细胞在体内,如在  $\beta$ -细胞功能障碍的动物模型中。在一个实施方案中,所述  $\beta$ -细胞在受试者体内,并且所述方法包括向所述受试者施用 CMPF。在一个实施方案中,所述受试者是具有储存和释放胰岛素的  $\beta$ -细胞的动物,如小鼠或大鼠。

[0091] 本领域技术人员将了解的是,施用合适剂量的 CMPF 以在体外或在受试者体内引起所需水平的  $\beta$ -细胞功能障碍。在一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用至少  $5\text{mg/kg}$  的 CMPF。在一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用至少  $7\text{mg/kg}$ 、至少  $10\text{mg/kg}$  或至少  $20\text{mg/kg}$ 。任选地, CMPF 可以口服、通过注射或通过任何其它手段来施用以使得血液中 CMPF 的水平增加。举例来说, CMPF 可以通过腹膜内注射、静脉内注射、皮下注射或肌肉注射以及经由经口灌胃或经由富含 CMPF 或前体脂肪酸的饮食来施用。在一个实施方案中,提供了一种可用于向受试者施用的组合物,所述组合物包含 CMPF 和一种或多种药学上可接受的载体。

[0092] 在一个实施方案中,使一个或多个  $\beta$ -细胞与 CMPF 接触引起了特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况,所述病况选自葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、妊娠期糖尿病、胰岛素抵抗或 2 型糖尿病。本领域技术人员将了解的是,使用本文所述的方法在体外、离体或体内引起  $\beta$ -细胞功能障碍可以被用于产生  $\beta$ -细胞功能障碍的模型。在一个实施方案中,本文所述的方法包括使用已被施用 CMPF 的  $\beta$ -细胞或受试者作为特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的动物模型。

[0093] 筛选化合物的方法

[0094] 在一个方面,提供了一种对影响  $\beta$ -细胞活性的药剂进行筛选的方法。如本文所

述,可以使用 CMPF 产生  $\beta$ -细胞功能障碍的模型。恢复或改善具有高于生理学上正常水平的 CMPF 的细胞中的  $\beta$ -细胞功能的药剂因此是用于治疗特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的候选者。在一个实施方案中,提供了一种筛选方法,所述方法包括:

[0095] (a) 提供一个或多个  $\beta$ -细胞,其中所述  $\beta$ -细胞的活性已通过使所述  $\beta$ -细胞与 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 接触而降低;

[0096] (b) 使所述  $\beta$ -细胞与测试药剂接触;以及

[0097] (c) 确定所述测试药剂对所述  $\beta$ -细胞活性的作用。

[0098] 任选地,所述  $\beta$ -细胞在体内、体外或离体。在一个实施方案中,所述  $\beta$ -细胞是胰岛细胞。在一个实施方案中,如果所述测试药剂对活性的作用高于阈值水平,那么将所述测试药剂鉴定为有效的。举例来说,在一个实施方案中,如果测试药剂使  $\beta$ -细胞的活性——与在通过使所述  $\beta$ -细胞与 CMPF 接触而使它们的活性降低之前所述细胞的活性相比——恢复至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40% 或至少 50%,那么可以将所述测试药剂鉴定为有效的。在一个实施方案中,所述活性是改善胰岛素的储存或分泌或对调节血液中葡萄糖的  $\beta$ -细胞的任何活性。举例来说,在一个实施方案中,所述活性是  $\beta$ -细胞的尺寸或活力,如通过检测  $\beta$ -细胞群扩增或  $\beta$ -细胞损失所确定。在一个实施方案中,所述活性是胰岛素胞吐。在一个实施方案中,所述活性是葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS)。还可以通过检测胰岛素基因或胰岛素转录因子基因、葡萄糖感应基因或胰岛素加工基因的转录或翻译来确定  $\beta$ -细胞的活性。在一个实施方案中,所述方法包括测定一种或多种胰岛素基因或胰岛素转录因子基因或一种或多种葡萄糖感应基因或一种或多种胰岛素加工基因的表达。在一个实施方案中,所述胰岛素基因或胰岛素转录因子基因是 INS、PDX1、MAFA 或 NKX6.1。在一个实施方案中,所述葡萄糖感应基因是 GLUT2、GLUT1 或 GCK。在一个实施方案中,所述胰岛素加工基因是 PCSK1、PCSK2 或 CPE。在一个实施方案中,所述基因选自 SLC2A1、SLC2A2、GCK、Kir6.2、ABCC8、CACNA1D、CACNA1A、CACNA1H、KCNB1、SNAP25、STX1A、VAMP2、SYN1A、PDX1、MAFA、NKX6.1、INS(在 小鼠中为 INS1 或 INS2)、PCSK1、PCSK2 以及 CPE。任选地,本文所述的基因是人基因或它们的非人对应用物。

[0099] 本领域技术人员将了解的是,可以使用许多不同的测定来测定  $\beta$ -细胞的活性。举例来说,可以通过 RT-PCR、定量 RT-PCR、微阵列或通过本领域已知的其它测定来测定相关基因的表达。

[0100] 在一个实施方案中,本文所述的筛选方法可用于鉴定影响  $\beta$ -细胞群扩增的化合物并且通过 Brdu 和 / 或 Ki67 测定来测定  $\beta$ -细胞的活性。在另一个实施方案中,本文所述的方法可用于鉴定影响  $\beta$ -细胞损失的化合物并且通过膜联蛋白 5-碘化丙锭染色、台盼蓝染色或胱天蛋白酶 3 活性测定 / 染色来测定  $\beta$ -细胞损失。

[0101] 使用 CMPF 抑制剂治疗  $\beta$ -细胞功能障碍

[0102] 如本文所述,高于正常水平的 CMPF 已经被证实与  $\beta$ -细胞功能障碍相关。降低具有升高水平的 CMPF 和 / 或患有特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的受试者体内循环的 CMPF 的水平因此预期对  $\beta$ -细胞活性具有有益的作用。此外,降低诸如  $\beta$ -细胞之类的胰岛细胞中 CMPF 的水平预期对  $\beta$ -细胞活性具有有益的作用。如实施例 2 中所示,OAT 转运蛋白在胰岛细胞中表达并且抑制 OAT 阻断 CMPF 对  $\beta$ -细胞功能的抑制作用。抑制患有特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的受试者中 OAT 转运蛋白功能因此预期对  $\beta$ -细胞活性具

有有益的作用。

[0103] 此外,如实施例 2 中所示,注射 CMPF 在体内损伤  $\beta$ -细胞功能并且阻止葡萄糖刺激的胰岛素分泌。诸如丙磺舒之类的 CMPF 抑制剂的使用消除了 CMPF 对葡萄糖刺激的胰岛素分泌的影响。值得注意的是,丙磺舒的施用还已经被证实会升高体内的循环 CMPF 水平而不改变葡萄糖耐量。虽然丙磺舒升高血液 CMPF 水平,但它被认为阻止 CMPF 进入  $\beta$  细胞并且因此保护  $\beta$  细胞免受 CMPF 的影响。降低血液和 / 或胰岛细胞中 CMPF 的生理水平的 CMPF 抑制剂因此预期可用于治疗  $\beta$ -细胞功能障碍,如在患有葡萄糖稳态受损的受试者中的  $\beta$ -细胞功能障碍。类似地, OAT 抑制剂和 / 或特异性 OAT 抑制剂,如对 OAT3 具有特异性的 PCG,预期可用于治疗  $\beta$ -细胞功能障碍。

[0104] 因此,在一个方面,提供了一种用于通过降低受试者中 CMPF 的生理水平来治疗特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向受试者施用 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 抑制剂。在一个实施方案中,所述方法包括降低受试者的胰岛细胞中 CMPF 的生理水平。任选地,所述受试者患有或疑似患有葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、胰岛素抵抗、妊娠期糖尿病或 2 型糖尿病。

[0105] 在一个实施方案中,还提供了 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 抑制剂用于治疗有需要的受试者中  $\beta$ -细胞功能障碍的用途。在一些实施方案中,所述 CMPF 抑制剂降低受试者中 CMPF 的生理水平,如在血液中循环的 CMPF 的水平和 / 或胰岛细胞中 CMPF 的水平。任选地,所述受试者患有或疑似患有葡萄糖耐量受损、糖尿病前期、胰岛素抵抗、妊娠期糖尿病或 2 型糖尿病。

[0106] 在一个方面,提供了一种用于治疗特征在于  $\beta$ -细胞功能障碍的病况的方法,所述方法是通过调节受试者中 CMPF 与一种或多种有机阴离子转运蛋白 (OAT) 的相互作用来实现。举例来说,在一个实施方案中,施用或使用 OAT 特异性抑制剂,如丙磺舒或青霉素 G (PCG) 有助于降低胰岛细胞中 CMPF 的生理水平。在一个实施方案中,施用或使用 OAT 特异性激活剂有助于降低血液中 CMPF 的生理水平。在一个实施方案中,OAT 特异性激活剂是 OAT4 的激活剂。

[0107] 用于鉴定或监测  $\beta$ -细胞功能障碍的试剂盒

[0108] 在一个实施方案中,提供了预先包装的试剂盒,所述试剂盒包含为进行本文所述的任一方法所必需的一些或所有试剂。任选地,所述试剂盒可以包括一种或多种对照样品。在一些实施方案中,已知所述对照样品含有特定水平的 CMPF,如约 20  $\mu$ M、约 50  $\mu$ M、约 100  $\mu$ M、约 150  $\mu$ M 或约 200  $\mu$ M。在其它实施方案中,所述试剂盒包括已知不含 CMPF 的阴性对照。在另一个实施方案中,已知所述对照样品含有一定水平的 CMPF 或对应于葡萄糖稳态受损或特征在于葡萄糖稳态受损或  $\beta$ -细胞功能障碍的特定病况。在一些实施方案中,所述试剂盒包括至少一种对 CMPF 具有选择性的抗体。在一些实施方案中,所述试剂盒将包括用于实施本文所述的方法的详细说明书。

[0109] 上述公开内容总体上描述了本申请。可以通过参考以下具体实施例获得更完全的了解。这些实施例仅是出于说明的目的而被描述的并且并不意图限制本申请的范围。如情形所建议或使得有利,形式上的变化以及等同方案的替代被涵盖在内。尽管已经在本文使用特定的术语,但这些术语意图具有描述性的意义而并不用于限制的目的。

[0110] 以下非限制性实施例用于说明本申请:

[0111] 实施例 1 :CMPF 是葡萄糖稳态受损的生物标志物

[0112] 材料与amp;方法

[0113] 从处在妊娠中期（第二个的妊娠期三个月）的晚期或者妊娠晚期（第三个的妊娠期三个月）的早期的女性采集血浆样品。首先在妊娠的 24 周与 28 周之间使用葡萄糖负荷测试 (glucose challenge test, GCT), 继而使用 3 小时 100g 葡萄糖口服葡萄糖耐量测试 (OGTT) 对葡萄糖耐量进行测试。基于这些测试的结果, 将女性分成以下 4 组 :妊娠期糖尿病 (GDM) 组、妊娠期葡萄糖耐量受损 (GIGT) 组、GCT 异常但 OGTT 葡萄糖耐量正常 (abGCT NGT) 组、以及 GCT 正常且 OGTT 正常 (NGT) 组。在空腹后, 在 OGTT 开始之前获得用于分析的血浆样品。

[0114] 使用选择反应监测质谱法 (SRM-MS) 与气相色谱法 (GC) 或液相色谱法 (LC) 的组合对空腹血浆样品进行测试来分离分析物以将 GDM 患者与 NGT 患者的代谢组进行定量比较。所述代谢组表示生物细胞、组织、器官或生物体中的所有代谢物的集合, 这些代谢物是代谢的副产物并且包括但不限于碳水化合物、氨基酸以及 FFA。响应于刺激, 如进食、运动以及在诸如 GDM 或 T2D 之类的病理生理病况中, 这些分子的相对丰度非常快速地发生变化。对来自每一组的十二个血浆样品进行研究并且在每一个样品中对 342 种指定的生化物质进行定量。使用低  $q$  值 ( $<0.1$ ) 来确定结果的置信度。

[0115] 结果

[0116] 在所研究的 342 种代谢物中, 有 52 种在 GDM 群体与 NGT 群体之间发生显著变化 ( $P<0.05$ )。基于生物学分类对代谢物进行的分组揭示与 NGT 患者相比, 患有 GDM 的患者具有显著增加的游离脂肪酸 (FFA) 水平, 这表示对替代性 (非葡萄糖) 能源的依赖增加 (图 1a)。与 NGT 样品相比, 在 GDM 样品中, 在筛选中发生最显著变化的代谢物, 即 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸 (CMPF) 显著升高 (5.69 倍)。对第二群组的样品进行的独立的筛选重复这一结果 (图 1b)。使用对人 CMPF 具有特异性的 ELISA 试剂盒, 在 48 个人血浆样品 (24 个 NGT 样品和 24 个 GDM 样品) 中进一步证实了这一研究结果 (图 2)。重要的是, CMPF 被证实在 5 名在 GDM 后在产后一年内产生 IGT 的女性中, 与 5 名在这两个时间段期间均维持 NGT 的女性相比甚至更显著地升高, 以及在 T2D 患者的混合性别群体中, 与 NGT 匹配对照相比甚至更显著地升高 (图 2)。这强烈地表明 CMPF 涉及 T2D 以及 GDM 的发生。此外, CMPF 的水平因此可用于在具有差不多正常的葡萄糖水平的受试者中预测葡萄糖稳态受损和 2 型糖尿病。

[0117] 由于  $\beta$  细胞衰竭是 GDM 和 T2D 这两者的主要的潜在原因, 因此在体外和体内这两方面对增加的 CMPF 对  $\beta$  细胞功能的影响进行研究。使用生理浓度的 CMPF ( $20 \mu\text{M}$  和  $200 \mu\text{M}$ , 如分别在我们的 NGT- 妊娠期样品和 GDM- 妊娠期样品中所观测到 (图 2)), 以及使用媒介物对照 (EtOH), 在永生化的鼠  $\beta$  细胞系 (MIN6) 以及原代分离的人胰岛和鼠胰岛中, 对 CMPF 对葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (GSIS) 和响应于使用促分泌素 KCl 进行的直接去极化的胰岛素分泌的影响进行研究 (图 3A)。与  $20 \mu\text{M}$  和媒介物对照相比, 使用  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 将单层 MIN6 细胞预处理 4 小时显著地损伤了 GSIS, 而使用  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 进行的相同的处理在人胰岛和鼠胰岛这两者中在 24 小时之后均引起等同的损伤 (图 3B、图 3C)。因此, 高的生理学上相关水平的 CMPF 损伤 GSIS。

[0118] 随后, 对在使用 CMPF 进行处理之后所观测到的 GSIS 受损的潜在机制进行研究。为

了确定 CMPF 是否是通过诱导  $\beta$  细胞发生细胞凋亡来抑制 GSIS, 在被媒介物 (EtOH)、 $20 \mu\text{M}$  或  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 处理 4 小时的 MIN6 细胞中进行膜联蛋白 V 和碘化丙锭染色以分别寻找细胞凋亡和坏死。在任一所述 CMPF 处理条件下均未观测到显著的染色, 尽管用  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 处理 4 小时引起了 GSIS 显著减少。使用被  $5\text{mM}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 3 小时的 MIN6 细胞作为阳性对照 (图 4)。CMPF 并不是通过诱导  $\beta$  细胞发生细胞凋亡或坏死来损伤 GSIS。

[0119] 在不存在细胞凋亡和坏死的情况下, CMPF 必然是通过引起  $\beta$  细胞功能障碍来损伤 GSIS。首先, 对 CMPF 处理对胰岛素生物合成的影响进行研究以确定是否有胰岛素可供用于在刺激后被释放。用媒介物对照、 $20 \mu\text{M}$  以及  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 将 MIN6、鼠胰岛和人胰岛处理 4 小时 (MIN6) 或 24 小时 (胰岛), 并且测量总胰岛素含量。在所有情况下, 与媒介物对照相比, 通过使用  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 进行处理使总胰岛素含量显著降低 (使用鼠胰岛作为代表, 图 5A)。在总 DNA 未发生变化的情况下观测到总胰岛素含量降低, 这证实了 CMPF 并未诱导细胞凋亡。更低的总胰岛素含量可能是由于从胰岛素原向成熟胰岛素的胰岛素加工有缺陷或胰岛素转录不足。为了确定 CMPF 降低总胰岛素含量的机制, 对从被媒介物对照或  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 处理 24 小时的鼠胰岛分离的 RNA 进行定量 PCR (qPCR)。观测到胰岛素 mRNA (图 5B) 以及胰岛素转录因子 PDX1、MAFA 和 HNF4a (图 5C) 显著减少, 这表明 CMPF 损伤胰岛素转录。此外, 观测到胰岛素加工酶 CpE 的 mRNA 水平显著更低, 并且 PCSK1 和 PCSK2 的水平趋向于更低 (图 5D)。总之, 这些结果表明 CMPF 通过抑制胰岛素转录和翻译后加工来引起  $\beta$  细胞功能障碍。

[0120] 所观测到的  $\beta$  细胞特异性转录因子 PDX1 的显著减少提示对于对接受 CMPF 处理的胰岛中关键的葡萄糖感应基因表达的可能抑制作用进行研究。PDX-1 已被报道对于  $\beta$  细胞葡萄糖转运蛋白 GLUT2 以及限速的葡萄糖加工酶葡萄糖激酶 (GCK) 的转录来说是必要的。再次使用 qPCR 来确定与接受媒介物处理的对照相比, 用  $200 \mu\text{M}$  的 CMPF 对鼠胰岛处理 24 小时显著地减少 GLUT2 的表达并且引起 GCK 的表达趋向于更低 (图 5E)。CMPF 因此可以通过降低 GLUT2 表达、阻止  $\beta$  细胞摄取并且随后代谢葡萄糖以刺激胰岛素分泌来损伤 GSIS。

[0121] 关于 CMPF 起作用以损伤  $\beta$  细胞功能的发现, 连同 GDM 患者、IGT 患者以及 T2D 患者的血浆 CMPF 浓度显著升高一起, 表明 CMPF 可能在 GDM 和 T2D 的发生中起致病作用。为了研究 CMPF 对葡萄糖稳态的影响, (图 8C)。血浆胰岛素水平显著增加连同血糖水平无差异一起表明, 与对照相比, CMPF 在接受处理的小鼠中诱发胰岛素抵抗。在三天的腹膜内注射之后, 在 14 小时禁食之后, 接受了 CMPF 注射的小鼠具有显著更高的血糖水平和显著更低的血浆胰岛素水平 (图 6C、图 6D), 而在七天的腹膜内注射之后, 小鼠具有显著更高的血糖水平和血浆胰岛素水平这两者, 再次表明胰岛素抵抗表型 (图 8D)。在三天的腹膜内注射之后, 在 OGTT 期间, 与媒介物对照组相比, CMPF 注射组在灌胃后的 10 分钟、20 分钟以及 30 分钟时具有显著受损的胰岛素分泌, 并且在 120 分钟时具有显著更高的胰岛素分泌 (图 6D)。胰岛素分泌的这种损伤对应于在灌胃后 30 分钟、60 分钟以及 120 分钟时显著更高的血糖。与接受媒介物注射的对照相比, 在七天的腹膜内 CMPF 处理之后, 小鼠在灌胃后 20 分钟、30 分钟、60 分钟以及 120 分钟时具有显著更高的血糖 (图 8D), 并且这对应于在灌胃后 10 分钟、30 分钟以及 60 分钟时显著受损的胰岛素分泌 (图 8E)。因此, 在体内血浆 CMPF 浓度升高引起  $\beta$  细胞功能受损并且阻止 GSIS, 从而导致葡萄糖不耐症。慢性升高的 CMPF 水平还

可能诱发胰岛素抵抗。总之,这些结果表明 CMPF 在 GDM 和 T2D 的发病中可能起致病作用。

[0122] 为了评估 CMPF 的体内施用直接对  $\beta$  细胞的影响,在 OGTT 后立即从接受了 3 天腹膜内注射和 7 天腹膜内注射的小鼠分离胰岛。在任何一种情况下,在接受 CMPF 注射的小鼠与接受媒介物对照注射的小鼠之间胰岛尺寸均不存在显著性差异,进一步证实了 CMPF 并不诱导  $\beta$  细胞发生细胞凋亡(图 7A,使用接受 3 天注射的情况作为代表)。然而,来自接受 CMPF 处理的小鼠的胰岛确实具有显著减少的 GSIS(图 7B)和更低的总胰岛素含量(图 7C,使用接受 3 天注射的情况作为代表),从而确认了在 OGTT 期间所观测到的胰岛素分泌减少。有趣的是,与接受媒介物注射的对照相比,从接受了 7 天 CMPF 注射的小鼠分离的胰岛在低的葡萄糖刺激下具有显著升高的胰岛素分泌,从而证实了在 14 小时禁食后在体内所观测到的显著更高的基础血浆胰岛素水平(图 8F)。总胰岛素含量降低对应于更低的胰岛素 mRNA 水平(图 7D,使用接受 3 天注射的情况作为代表),这与本文所述的体外研究相一致。

[0123] 与 NGT 对照相比,在患有 GDM、IGT 的女性以及 T2D 患者的混合群体的血浆中 CMPF 的水平显著升高,表示这种化合物在糖尿病的发生中可能起重要作用。这得到了在永生化的  $\beta$  细胞系(MIN6)以及分离的原代人胰岛和鼠胰岛中的体外数据的支持,所述体外数据证实在孵育 24 小时之后,在糖尿病患者血浆中所观测到的浓度的 CMPF 损伤 GSIS。对 GSIS 的这种损伤并不是因为  $\beta$  细胞发生细胞凋亡或坏死,而可能是由对胰岛素生物合成(转录和翻译后加工)的损伤以及葡萄糖感应、摄取以及代谢的能力降低所引起。在小鼠中进行的急速体内研究证实 CMPF 损伤胰岛素分泌并且引起葡萄糖不耐症。对这些胰岛进行的离体评价证实在胰岛尺寸方面不存在差异(表示不存在细胞凋亡),但 GSIS 的能力显著降低。总而言之,这表明 CMPF 可能是与 GDM 和 T2D 相关的  $\beta$  细胞衰竭的潜在原因。

[0124] 在患有 GDM 的女性和患有 T2D 的患者的血浆中 CMPF 水平显著升高的这一事实表示 CMPF 可用作一种早期的生物标志物以通过简单的血液测试来预测 GDM 或 T2D 而无需使用 GCT 或 OGTT,所述 GCT 或 OGTT 是费时的并且使患者非常不愉快。这对于诊断 GDM 来说将是特别有用的,这是因为不能使用 HbA1c 测试。如果 CMPF 在病因上涉及于 T2D 的发生,那么预期其水平在高的 HbA1c 读数之前就会升高,从而允许在患者暴露于较长时间高血糖之前进行医学干预。

[0125] 在糖尿病患者中所观测到的生理学上相关的水平(200  $\mu$ M)下, CMPF 在相对短的一段时间(3 天的腹膜内注射)内损伤 GSIS 并且引起葡萄糖不耐症,这表明 CMPF 对  $\beta$  细胞有直接影响。从腹膜内 CMPF 注射的第四天开始观测到胰岛素抵抗的胰腺外影响,这表明 CMPF 起作用以直接损伤  $\beta$  细胞功能以及增加外周组织中的胰岛素抵抗。因此,抑制患有 GDM 或 T2D 的糖尿病前期患者和糖尿病患者中的 CMPF 活性可以改善  $\beta$  细胞功能并且改善外周胰岛素敏感性,并且从而是一种对 GDM 和 / 或 T2D 可行的治疗。

[0126] 实施例 2:抑制 CMPF 以治疗  $\beta$ -细胞功能障碍

[0127] 如实施例 1 和图 10 中所示,在妊娠期糖尿病患者和 2 型糖尿病患者的血浆中所观测到的浓度下, CMPF 损伤  $\beta$  细胞功能和全身的葡萄糖稳态。CMPF 最初被鉴定为一种潜在的尿毒症毒素,大部分有关 CMPF 所进行的研究集中在鉴定它与肾脏的相互作用。最新的研究已鉴定出两种有机阴离子转运蛋白,即 OAT1(SLC22A6)和 OAT3(SLC22A8),它们负责将 CMPF 从血浆转运到基侧外侧膜的近端小管细胞中;以及第三种有机阴离子转运蛋白

OAT4(SLC22A11),它负责 CMPF 在尿中的排泄 (Deguchi 等, 2005) (图 11)。OAT 充当有机阴离子交换因子,将一个阴离子分子转运到细胞中并且同时将一个内源性二羧酸从细胞中转运出来 (Sekine 等, 2006)。内源性二羧酸在细胞内的存在因此对于 OAT 功能来说是关键的,因而它们连同二羧酸钠协同转运蛋白 NaDC3 (SLC13A3) 一起表达,该 NaDC3 的功能在于将二羧酸转运回细胞中 (图 11)。

[0128] CMPF 对 GSIS 的影响

[0129] 使用 OAT 特异性抑制剂丙磺舒、对氨基马尿酸盐 (PAH) 以及芑青霉素 (PCG) 进行的研究已经证实通过阻断 OAT1 和 OAT3 这两者, CMPF 的分泌在体内可以被完全抑制 (Deguchi 等, 2005)。丙磺舒是 OAT 的竞争性抑制剂并且通过优先地结合所述转运蛋白,阻止 CMPF 和其它 OAT 配体与转运蛋白结合来起作用。在痛风的治疗中,丙磺舒通过阻止尿酸与 OAT4(OAT1 和 OAT3 的同源物,位于近端小管细胞的管腔侧上) 结合来阻止尿酸从尿中被重新摄取到近端小管中,从而限制回到血液供应的尿酸的量并且因此消除痛风 (Mason, 1954)。当联同抗生素一起给予时,丙磺舒通过阻止所述抗生素经由 OAT1 被摄取到肾脏中来延长抗生素在血流中的循环 (Butler, 2005)。丙磺舒的施用会引起 CMPF 的清除率降低,从而导致 CMPF 在血浆中积聚 (Costigan 等, 1996) (图 12A)。在接受丙磺舒处理的小鼠的血浆中尿酸水平显著更低,这表示尿酸经由 OAT 转运蛋白的重新摄取受损,进一步支持了对 OAT 转运蛋白活性的阻断 (图 12B)。在使用选择性抑制 OAT3 的浓度的 PCG 的情况下,已经证实 65% -75% 的 CMPF 分泌被阻止,这表示所述 OAT3 是肾脏中主要的 CMPF 转运蛋白 (Deguchi 等, 2005)。

[0130] 肾脏中的 OAT 转运蛋白

[0131] OAT 转运蛋白的表达在 T2D 的啮齿动物模型的肾脏中显著降低 (Mishra 等, 2004)。在 T2D 的 db/db 小鼠模型中,通过微阵列所测定, OAT3 转运蛋白和 OAT1 转运蛋白这两者具有显著降低的表达 (Mishra 等, 2004 ;More 等, 2012)。这一研究结果表明在 GDM 患者和 T2D 患者的血浆中 CMPF 的水平可能由于它的转运蛋白在肾脏中的表达下调、从而限制它被分泌到尿中的能力而升高。这种假设符合在肾衰竭和尿毒症期间所观测到的血浆 CMPF 水平升高。在这些生理病况下, OAT1、OAT3、OAT4 以及 NaDC3 均已被报道在肾脏中具有显著减少的表达 (Deguchi 等, 2005)。

[0132] 阻断 OAT 转运蛋白功能引起了小鼠中血浆 CMPF 浓度增加

[0133] 本发明的说明内容提供了意想不到的在 OAT1、OAT3、NaDC3 或 OAT4 与糖尿病之间的联系。葡萄糖耐量正常 (NGT) 的小鼠胰岛和人胰岛的微阵列数据证实相对于已知在胰岛中表达的其它蛋白质, OAT1、OAT3 以及 NaDC3 强表达 (使用小鼠胰岛作为代表, 图 13A)。不存在 OAT4 的小鼠等效物。这一表达谱进一步得到了对纯化的人  $\beta$  细胞、小鼠胰岛以及源自于小鼠和大鼠的  $\beta$  细胞系进行的转录组分析的支持,所述分析均证实了 OAT1、OAT3 以及 NaDC3 的相对强的表达 (Kutlu 等, 2009)。有关这些转运蛋白在胰岛中表达的这一研究结果在人胰岛中使用免疫荧光染色和蛋白质印迹进一步证实,如图 13B、图 13C 中所示。有趣的是,主要的 CMPF 转运蛋白 OAT3 和协同转运蛋白 NaDC3 在表达胰岛素的 ( $\beta$ ) 细胞中显示出最强的染色,而 OAT1 和 OAT4 在非胰岛素阳性细胞 (推测为  $\alpha$  细胞、 $\delta$  细胞以及  $\epsilon$  细胞) 中显示出更强的染色 (图 13B)。通过蛋白质印迹,在人胰岛和人近端小管细胞系 HK-2 中发现对应于 OAT1、OAT3、OAT4 以及 NaDC3 的强条带。对 T2D 胰岛的转录组进行探究的研究

证实与健康对照相比, OAT1 和 OAT3 在 T2D 胰岛中的表达显著增加 (Dominguez 等, 2011)。因此有可能的是, 在 T2D 中, 胰腺  $\beta$  细胞中增强的 OAT1 和 OAT3 表达使 CMPF 向  $\beta$  细胞中的转运增加, 从而导致 CMPF 介导的  $\beta$  细胞功能障碍。

[0134] OAT 转运蛋白在胰岛细胞中表达。

[0135] 为了确定 OAT 转运蛋白是否负责将 CMPF 转运到  $\beta$  细胞中, 在添加 CMPF 之前将 CD1 小鼠胰岛用 1mM 丙磺舒预处理以确保通道被阻断并且 CMPF 从细胞中完全排除。1mM 丙磺舒的剂量是基于以下先前的证据来选择的: 这一浓度足以抑制从  $\beta$  细胞的阴离子转运而对葡萄糖刺激的胰岛素分泌没有任何所观测到的影响 (Arkhammar 等, 1989)。将胰岛用 1mM 丙磺舒预处理 3 小时, 之后添加 200  $\mu$ M 的 CMPF。在 24 小时之后, 通过 GSIS 对细胞进行评估。与媒介物对照相比, 单独使用 200  $\mu$ M 的 CMPF 进行处理使得 GSIS 在高葡萄糖刺激和 KCl 刺激这两种条件下均显著减少, 这与先前的研究结果一致, 而使用 1mM 丙磺舒处理 27 小时对 GSIS 没有影响。使用 1mM 丙磺舒连同 200  $\mu$ M 的 CMPF 一起 (CMPF+P) 对胰岛进行处理完全消除了 CMPF 对胰岛的影响 (图 14A)。接受 CMPF+P 处理的胰岛表现出与接受媒介物处理的对照相当的高葡萄糖刺激和 KCl 刺激的胰岛素分泌。因此, 丙磺舒抑制 CMPF 的作用。使用 OAT3 特异性抑制剂 PCG 获得相似的结果。再次将胰岛用 300  $\mu$ M 的 PCG 预处理 3 小时, 之后使用 200  $\mu$ M 的 CMPF 处理 24 小时 (图 14B)。单独的 CMPF 能够显著地抑制在高葡萄糖刺激下的胰岛素分泌, 而 300  $\mu$ M 的 PCG 没有显著的影响。使用 300  $\mu$ M 的 PCG 和 200  $\mu$ M 的 CMPF 进行的处理抑制了 CMPF 的作用, 从而产生对照水平的胰岛素分泌。

[0136] 抑制 OAT 阻断 CMPF 对  $\beta$  细胞功能的抑制作用

[0137] 虽然丙磺舒的施用升高循环 CMPF 水平, 但这并未改变葡萄糖耐量, 表明 CMPF 在体内经由 OAT 改变  $\beta$  细胞功能。每天两次对小鼠腹膜内注射 150mg/kg 的丙磺舒, 持续 3 天, 如先前所述 (Baudoux 等, 2012)。在体重或空腹血糖方面没有观测到差异 (图 15A、图 15B)。在第 4 天, 进行 2g/kg 的 OGTT 并且葡萄糖耐量方面未显示出显著性差异 (图 15C)。由于单独使用 CMPF 处理 3 天能够诱发葡萄糖不耐症, 因此看来丙磺舒阻断了 CMPF 对  $\beta$  细胞的活性。

[0138] 实施例 3: 表征 CMPF 对  $\beta$  细胞功能的影响。

[0139] 妊娠期糖尿病 (GDM) 是一种对母亲和儿童存在严重的健康影响的病况, 由  $\beta$  细胞不能适应增加的代谢需求所引起。GDM 以及非常高的向 2 型糖尿病 (T2D) 的进展率的原因仍是未知的。如实施例 1 中所示, 在患有 GDM、T2D 以及糖尿病前期的人的血浆中, 呋喃脂肪酸代谢物 CMPF 显著升高。在小鼠中, 糖尿病患者水平的 CMPF 诱发葡萄糖不耐症、葡萄糖刺激的胰岛素分泌受损以及葡萄糖的利用降低。在此, 本申请的发明人证实 CMPF 经由新颖转运机制进入  $\beta$ -细胞中以被代谢, 从而导致线粒体功能受损、氧化应激、关键的  $\beta$ -细胞转录因子 PDX1 和 FOXO1 失调、以及最终的胰岛素生物合成减少。重要的是, CMPF 诱导的  $\beta$  细胞功能障碍可以通过特异性阻断它的转运或经由抗氧化剂治疗来阻止。

[0140] 材料与amp;方法

[0141] 高胰岛素 - 正常血糖钳夹

[0142] 在用 CMPF 或媒介物腹膜内注射 7 天之后, 如先前所述 (Liu 等, 2012) 进行高胰岛素 - 正常血糖钳夹。在注射方案的第 3 天进行内部和外部套管插入术。

[0143] 基因表达

[0144] 使用 Qiagen RNeasy Plus 小型试剂盒 (德国的希尔登 (Hilden, Germany)) 从被媒介物或 CMPF 处理 24 小时的胰岛中提取总 RNA。如先前所述 (Basford 等, 2012), 在大学健康网络微阵列中心 (University Health Network microarray center) (加拿大的多伦多 (Toronto, Canada)) 使用 Affymetrix 小鼠 4302.0 基因芯片进行微阵列分析。显著性变化被限定为  $P < 0.05$ 。微阵列数据在公开时将可在 NCBI GEO 数据库上获得。人胰岛微阵列数据可以见于 GEO40709 处。如先前所述 (Basford 等, 2012) 进行从总 RNA 进行的逆转录和定量实时 PCR (qPCR) 分析。使用 Primer3 软件 (NCBI) 设计引物。针对  $\beta$  肌动蛋白的 mRNA 将数据归一化。

[0145] 分离的胰岛中的 ROS 积聚和胰岛尺寸

[0146] 如先前所述 (Lee 等, 2009), 分别使用 mitoSOX 红 (mitoSOX red) 和 2', 7' - 二氯二氢荧光素二乙酸酯 (CM-H<sub>2</sub>-DCFDA) (Molecular Probes, 加拿大的英杰公司 (Invitrogen, Canada)) 测定分离的被媒介物对照或 200  $\mu$ M 的 CMPF 处理 4 小时或 24 小时的胰岛中的超氧化物和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的水平。使用明视场图像来测定胰岛尺寸。

[0147] 线粒体膜电位 (MMP)

[0148] 将分散的分离的胰岛用媒介物对照或 200  $\mu$ M 的 CMPF 处理 24 小时, 之后加入于 2.8mM 葡萄糖成像缓冲液中的罗丹明 (rhodamine) 123 (25  $\mu$ g/ml, 10 分钟)。添加 5mM NaN<sub>3</sub> 以使 MMP 完全去极化 (Diao 等, 2008)。

[0149] 蛋白质印迹

[0150] 将接受了 CMPF 处理的小鼠胰岛和对照小鼠胰岛在含有蛋白酶抑制剂混合液 (加拿大安大略省密西沙加的罗氏公司 (Roche, Mississauga, ON, Canada)) 的 RIPA 缓冲液 (美国马萨诸塞州丹弗斯的细胞信号转导公司 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)) 中裂解。使裂解产物以 12,000rpm 离心并且将上清液上样到 4-15% 的 SDS-PAGE 梯度凝胶 (加拿大安大略省密西沙加的伯乐公司 (BioRad, Mississauga, ON, Canada)) 上并且使用 Turbo 印迹装置 (伯乐公司) 转移到 PVDF 膜上。将膜用相应的抗体进行探测, 并且使用 Kodak 成像器 4000pro (美国纽约州罗彻斯特的锐珂公司 (Carestream, Rochester, NY, USA)) 成像。

[0151] 免疫荧光染色

[0152] 使用免疫荧光确定了 FOXO1 和 PDX1 在分散的 CD1 小鼠胰岛细胞中的细胞定位。使用免疫荧光还确定了有机阴离子转运蛋白 (OAT) 在分散的人胰岛细胞中的存在。如先前所述 (Diao 等, 2008) 进行染色。使用共聚焦显微镜 (Quorum Wave FX 转盘式; 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的珀金埃尔默公司 (Perkin Elmer, Waltham ML, USA)) 和 Volocity 软件 (珀金埃尔默公司) 获取图像。

[0153] 结果

[0154] CMPF 降低全身的葡萄糖利用

[0155] 如实施例 1 中所示, 升高的血浆 CMPF 导致葡萄糖不耐症和胰岛素分泌受损。有趣的是, 尽管 GSI 有缺陷, 但七天的 CMPF 处理与进食状态下的高胰岛素血症和高胰高血糖素血症有关。尽管胰岛素水平升高, 但通过胰岛素耐量测试 (ipITT) 在接受 CMPF 处理的小鼠与接受媒介物处理的小鼠之间未观测到胰岛素敏感性存在显著性差异。为了更充分地研究整体的葡萄糖稳态, 进行高胰岛素 - 正常血糖钳夹。如图 16 中所示, 虽然葡萄糖输注率显著降低 (图 16b), 但总体糖酵解率表明对胰岛素的响应不存在差异 (钳夹后 / 基础) (图

16e)。因此,葡萄糖输注的差异是由于在基础时葡萄糖的出现率显著更低(图 16c),以及在钳夹后胰岛素的出现率显著降低(图 16d)。7 天的 CMPF 处理并未诱发胰岛素抵抗,但降低了全身的葡萄糖利用。

[0156] CMPF 被代谢以增加 ROS

[0157] 总胰岛素含量更低可能是由于由过度刺激和 / 或有缺陷的胰岛素产生所引起的  $\beta$ -细胞耗竭。为了确定 CMPF 减少胰岛素含量的机制,我们测量了在处理 24 小时后基质中的胰岛素。总胰岛素的积聚不存在差异(数据未示),然而,与对照相比,接受 CMPF 处理的胰岛的基质中存在显著更多的胰岛素原,这与在 T2D 患者中所观测到的胰岛素原:胰岛素比率发生改变(Kamoda 等, 2006)相一致(图 17a)。胰岛素加工受损先前已与线粒体蛋白解偶联蛋白 2(UCP2)的水平升高有关(Kashemsant 和 Chan, 2006)。电子传递链的底物过量引起 ROS 形成,所述 ROS 能够诱导 UCP2 表达。首先为了确定 CMPF 是否由  $\beta$ -细胞代谢,我们对接受 CMPF 急速处理的小鼠胰岛中线粒体膜电位(MMP)的变化进行测量。CMPF 引起瞬时的膜超极化,这与经由  $\beta$ -氧化所产生的质子动力增加相一致(图 17b)。这对应于在处理 4 小时和 24 小时之后,接受 CMPF 处理的胰岛中的 ROS 增加到对照的 2 倍(图 17c)。在 CMPF 处理 24 小时之后包括 Ucp2 和过氧化氢酶(Cat)在内的抗氧化基因表达增加,表明细胞针对氧化应激在进行抵偿(图 17d、图 17e)(Robson-Doucette 等, 2011)。通过用抗氧化剂 N-乙酰基-半胱氨酸(NAC)进行共同处理抑制了由 CMPF 处理所引起的 ROS 产生增加(图 17f)。重要的是,在接受 CMPF 处理的胰岛中,用 NAC 进行的共同处理使胰岛素分泌和胰岛素含量恢复到接近对照水平(图 17g、图 17h)。因此,由 CMPF 代谢所引起的氧化应激使 GSIS 和胰岛素加工受损,并且可经由减少 ROS 产生而逆转。

[0158] CMPF 损伤胰岛素生物合成

[0159] 升高的 ROS 已被证实经由 AKT 和 GSK3 $\beta$  活性的改变(Kawamori 等, 2006; Boucher 等, 2006; Kawamori 等, 2003)来调节胰岛素转录(Poitout 和 Robertson, 2008; Robertson, 2004)。为了确定 CMPF 减少胰岛素生物合成的机制,我们对它对这些关键的调节因子的影响进行研究。在正常条件下, AKT 和 GSK3 $\beta$  具有互逆的活性。活性的 pAKT 使 GSK3 $\beta$  磷酸化并且失活,从而防止下游靶标磷酸化(Humphrey 等, 2010)。然而,在氧化应激的条件下, AKT 不具活性(Kawamori 等, 2006)。与对照相比,在 CMPF 处理 24 小时之后, AKT 和 GSK3 $\beta$  这两者的磷酸化显著受损(图 17i、图 17j),这表示 AKT 活性降低并且 GSK3 $\beta$  活性增加。为了确定这些变化对胰岛素转录是否有影响,使用免疫荧光染色对两种关键的胰岛素转录因子,即 PDX1 和 FOXO1 的定位进行研究。FOXO1 通常由于被 AKT 磷酸化而被隔离在胞质中(Kitamura 等, 2005)。在接受 CMPF 处理的胰岛中, FOXO1 易位到核中(图 17k、图 17m),这反映了 AKT 活性降低(Kawamori 等, 2007)。相反,直接被 GSK3 $\beta$  磷酸化的 PDX1(Boucher 等, 2008)被隔离在核的外部,这与 GSK3 $\beta$  活性增加相一致(图 17l、图 17n)。这些转录因子的绝对水平并没有显著的差异,这表示定位发生改变并不是由于蛋白质丰度发生变化(图 17o)。通过使用抗氧化剂 NAC 进行处理阻止了 FOXO1 和 PDX1 这两者的易位,这表示氧化应激促使有缺陷的胰岛素生物合成(图 17k-n)。这些转录因子的活性发生改变进一步由包括 Ins1、转录因子 Pdx1 和 Mafa、胰岛素原加工酶 CpE、Pc1 和 Pc2、以及葡萄糖转运蛋白 Glut2 在内的关键的靶基因的 mRNA 水平降低所确认(Boucher 等, 2006; Kaneto 等, 2008)(图 18a)。

#### [0160] CMPF 改变葡萄糖代谢

[0161] 鉴于 CMPF 在体内在进食状态期间引起高胰岛素血症,并且在体外在非刺激条件下增大胰岛的胰岛素分泌,我们合理地认为,葡萄糖感应和 / 或胰岛素分泌中必然存在不能仅仅由对胰岛素产生的影响来解释的缺陷。与 FFA 代谢相关的 ROS 升高已被证实非刺激性葡萄糖浓度下刺激胰岛素分泌 (Robson-Doucette 等, 2011 ;Saddeh 等, 2012 ;Joseph 等, 2004)。当与接受媒介物处理的对照相比时,被 200  $\mu$ M 的 CMPF 处理 24 小时的分散的小鼠胰岛在亚刺激性葡萄糖浓度下显示出显著更大的 MMP 超极化,并且在高葡萄糖条件下显示出显著降低的 MMP 超极化,这与 ROS 升高相一致 (图 17b)。这些数据表明 CMPF 代谢引起过度的质子动力,从而导致在低葡萄糖条件下胰岛素分泌增加,并且还损伤葡萄糖代谢并且因而损伤 GSIS。为了确认线粒体功能的变化,通过微阵列对被 CMPF 处理 24 小时的胰岛进行分析。总体而言,在 CMPF 处理后,6.2% 的转录物进行有显著差异的表达。当基于生物过程进行整理时,最大差异表达的群集包括涉及代谢的基因 (38%) (图 17c)。具体而言,观测到与脂肪氧化相关的基因显著上调,这表明从葡萄糖氧化驱动的代谢‘转变’成脂肪氧化 (Elks 等, 1993)。这种转变能够降低  $\beta$ -细胞感应和代谢葡萄糖的能力,限制它们对于 GSIS 的能力,从而可以解释 CMPF 对  $\beta$ -细胞的影响 (Hue 等, 2009)。

#### [0162] CMPF 经由 OAT3 进入 $\beta$ -细胞

[0163] 包括 CMPF 在内的二元尿呋喃酸通常被分泌到尿中 (Deguchi 等, 2005), 并且已知 CMPF 在尿毒症患者的血浆中由于负责它们的清除的有机阴离子转运蛋白 (OAT) 丧失而升高 (Sassa 等, 2000)。OAT3 (Slc22a8) 和 OAT1 (Slc22a6) 将 CMPF 转运到肾近端小管细胞中并且需要协同转运蛋白 NaDC3 来起作用 (Deguchi 等, 2004)。在人中, OAT4 (Slc22a11) 是将 CMPF 从近端小管移到肾管腔中的外排转运蛋白 (Deguchi 等, 2005)。我们因此研究 CMPF 是否也经由这些转运蛋白进入  $\beta$ -细胞。对人胰岛进行的微阵列分析证实所有四种转录物都在与  $\beta$ -细胞 KATP 通道 Kcnj11 相当的水平上表达 (图 19a)。这进一步通过 RT-PCR (用对应于这些转运蛋白中的每一种的条带) 以及通过免疫印迹所证实 (图 19b、图 19c)。为了确定蛋白质定位,我们在分散的人胰岛细胞中进行免疫荧光染色 (图 19d)。在胰岛素阳性的  $\beta$ -细胞中, OAT3 和 NaDC3 显示出强染色。OAT1 和 OAT4 主要在胰岛素阴性细胞中表达。与胰高血糖素的共染色揭示 OAT4 也不在胰高血糖素阳性细胞中表达。因此, OAT 转运蛋白在胰岛中表达, OAT3 和 NaDC3 在胰岛素阳性细胞中强表达。

[0164] 为了确定 OAT 是否负责将 CMPF 转运到  $\beta$ -细胞中,我们利用了 OAT 功能的抑制剂。丙磺舒是一种非特异性 OAT 阻断剂 (Miyamoto 等, 2012)。用 1mM 丙磺舒将胰岛处理 24 小时使接受 CMPF 处理的胰岛的胰岛素分泌恢复到对照水平 (图 19e)。为了确定哪种 OAT 主要负责将 CMPF 转运到  $\beta$ -细胞中,我们使用 300  $\mu$ M 的苜青霉素 (PCG) (一种 OAT3 特异性抑制剂) 或 50  $\mu$ M 的对氨基马尿酸盐 (PAH) (一种 OAT1 特异性抑制剂) (Deguchi 等, 2005) 对胰岛进行处理。与 OAT3 是主要的 CMPF 转运蛋白的先前报道 (Deguchi 等, 2005) 相一致, PCG 能够使接受 CMPF 处理的胰岛的胰岛素分泌和胰岛素含量恢复到对照水平 (图 19f、图 19h)。然而,用 PAH 进行的处理对分泌没有影响 (图 19g)。因此, CMPF 经由 OAT3 被转运到  $\beta$ -细胞中,并且阻断这种转运蛋白阻止 CMPF 损伤 GSIS 和胰岛素生物合成。

#### [0165] 讨论

[0166] GDM 和 T2D 这两者的潜在原因在于  $\beta$ -细胞不能响应变化的代谢需求 ;即,胰岛

素抵抗增加 (Buchanan, 2001 ;Kahn 2003 ;Prenki 和 Nolan, 2006)。在此,我们证实了在患有 GDM、T2D 以及葡萄糖耐量受损的患者中所观测到的浓度下、在从 GDM 转变成 T2D 期间,脂肪酸代谢物 CMPF 损伤胰腺  $\beta$ - 细胞功能,这与在这期间  $\beta$ - 细胞功能进行性下降 (Retnakaran 等, 2010) 相一致。使用 CMPF 进行的处理再现了糖尿病的许多关键的特征,包括基础高胰岛素血症 (Wijendran 等, 1999) 以及 GSIS 受损和全身葡萄糖利用降低 (Kuhl, 1991 ;Bowes, 1996)。在体外,我们证实了 CMPF 代谢经由损伤线粒体功能和葡萄糖代谢以及诱导氧化应激而引起  $\beta$ - 细胞功能障碍。ROS 水平升高改变了关键激酶 AKT 和 GSK3  $\beta$  的活性,从而改变转录活性,并且最终减少胰岛素转录和翻译后加工。因此,升高的血浆 CMPF 可能在与 GDM、T2D 以及从 GDM 向 T2D 进展相关的  $\beta$ - 细胞功能障碍中起重要的致病作用。

[0167] CMPF 的影响可以通过两种独特的方法来解除:阻断 CMPF 进入到  $\beta$ - 细胞中以及减少 ROS 积聚。在此,我们首次证实 CMPF 经由 OAT3 转运蛋白进入  $\beta$ - 细胞,所述 OAT3 转运蛋白先前仅是在肾近端小管细胞的基侧外侧膜上被功能性地表征 (Deguchi 等, 2005), 并且据报道,在肝脏和脑中具有低水平的表达 (Sweet 等, 2002 ;Deguchi 等, 2006)。我们证实了 CMPF 转运可以使用通常的处方药丙磺舒和苜青霉素来阻断,丙磺舒和苜青霉素分别非特异性地抑制和特异性地抑制 OAT3 转运蛋白。有趣的是,我们证实了虽然人  $\beta$ - 细胞表达内流转运蛋白 OAT3,但不存在外排转运蛋白 OAT4。因此,在糖尿病期间,当血浆 CMPF 可能由于肾脏中 OAT 活性发生改变而升高时,推测其可以进入  $\beta$ - 细胞,但不离开,从而促进它的代谢和相关的影响。因此,经由阻断 OAT 转运蛋白来阻止 CMPF 流入,或增加 CMPF 从  $\beta$ - 细胞的外排是未来对预防  $\beta$ - 细胞衰竭进行研究的有吸引力的途径。

[0168] 一旦处于  $\beta$ - 细胞内部, CMPF 就被代谢,从而引起葡萄糖利用受损和 ROS 产生增加。低水平的 ROS 产生会增强 GSIS,从而有助于  $\beta$ - 细胞响应于包括 FFA 在内的营养物质的急速增加 (Robson-Doucette 等, 2011 ;Saadeh 等, 2012 ;Poitout 和 Robertson, 2008)。然而,长期来看,由于抗氧化酶的表达相对于其它组织类型相对较低,因此  $\beta$ - 细胞特别易受氧化应激影响 (Robson-Doucette 等, 2011 ;Robertson, 2004)。用抗氧化剂进行治疗已被提出作为一种用于治疗 T2D 的有前景的方法,并且已被证实在啮齿动物模型中减轻胰岛纤维化和细胞凋亡并且改善葡萄糖耐量和胰岛素敏感性 (Lee 等, 2011)。我们使用抗氧化剂 NAC 进行预处理阻止了 CMPF 诱导  $\beta$ - 细胞衰竭的研究结果表明抗氧化剂治疗还可以用于预防和 / 或治疗 GDM。

[0169] 虽然已经参考目前所认为的优选的实施例对本发明进行描述,但应当了解的是,本发明不限于所公开的实施例。相反,本发明意图涵盖包括在所附权利要求书的精神和范围内的各种改动方案和等同布置。

[0170] 所有公开、专利以及专利申请以引用的方式整体并入本文,该引用的程度就如同每一件单独的公开、专利或专利申请均被明确地并且单独地表明以引用的方式整体并入本文一样。

[0171] 参考文献

[0172] Arkhammar P. 等, Glucose-stimulated efflux of FURA-2in pancreatic beta-cells is prevented by probenecid(通过丙磺舒阻止在胰腺  $\beta$ - 细胞中葡萄糖刺激的 FURA-2 外排), Biochemical and Biophysical Research

Communications. 1989. 159(1): 第 223-228 页。

[0173] Basford, C. L. 等, The functional and molecular characterisation of human embryonic stem cell-derived insulin-positive cells compared with adult pancreatic beta cells(人胚胎干细胞衍生的胰岛素阳性细胞与成人胰腺  $\beta$  细胞相比的功能和分子表征), *Diabetologia*, 2012. 55(2): 第 358-71 页。

[0174] Baudoux T. E. R. 等, Probenecid prevents acute tubular necrosis in a mouse model of aristolochic acid nephropathy(丙磺舒阻止小鼠马兜铃酸肾病模型的急性肾小管坏死), *Kidney International*. 2012. 82(10)。

[0175] Boucher, M. J. 等, Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms(磷酸化标记 IPF1/PDX1 蛋白通过糖原合酶激酶 3 依赖性机制的降解), *J Biol Chem*, 2006. 281(10): 第 6395-403 页。

[0176] Bowes, S. B. 等, Measurement of glucose metabolism and insulin secretion during normal pregnancy and pregnancy complicated by gestational diabetes(在正常妊娠期和并发妊娠期糖尿病的妊娠期期间葡萄糖代谢和胰岛素分泌的测量), *Diabetologia*, 1996. 39(8): 第 976-83 页。

[0177] Buchanan, T. A., Pancreatic B-cell defects in gestational diabetes: implications for the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes(妊娠期糖尿病中的胰腺 B-细胞缺陷: 2 型糖尿病的发病和预防的启示), *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(3): 第 989-93 页。

[0178] Butler, D., Wartime tactic doubles power of scarce bird-flu drug(战争策略使稀缺的禽流感药物的效力加倍), *Nature*, 2005. 438(7064): 第 6 页。

[0179] Costigan, M. G. 和 W. E. Lindup, Plasma clearance in the rat of a furan dicarboxylic acid which accumulates in uremia(在尿毒症中积聚的呋喃二羧酸在大鼠中的血浆清除), *Kidney Int*, 1996. 49(3): 第 634-8 页。

[0180] Deguchi, T. 等, Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney(在肾脏中通过有机阴离子转运蛋白进行的尿毒症毒素转运的表征), *Kidney Int*, 2004. 65(1): 第 162-74 页。

[0181] Deguchi T. 等, Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats(在尿毒症大鼠中内源性马尿酸盐的肾脏清除与肾脏有机阴离子转运蛋白的表达水平具有相关性), *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 314(2): 第 932-8 页。

[0182] Deguchi, T. 等, Differential contributions of rOat1(Slc22a6) and rOat3(Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats(rOat1(Slc22a6) 和 rOat3(Slc22a8) 对大鼠体内肾脏对尿毒症毒素的摄取的不同影响), *Pharm Res*, 2005. 22(4): 第 619-27 页。

[0183] Deguchi, T. 等, Involvement of organic anion transporters in the efflux of uremic toxins across the blood-brain barrier(有机阴离子转运蛋白涉及尿毒症毒素穿过血脑屏障的外排), *J Neurochem*, 2006. 96(4): 第 1051-9 页。

[0184] Diao, J. 等, UCP2 is highly expressed in pancreatic alpha-cells and

influences secretion and survival(UCP2 在胰腺  $\alpha$ - 细胞中高表达并且影响分泌和存活), Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(33): 第 12057-62 页。

[0185] Dominguez V. 等, Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic beta cells(II 类磷酸肌醇 3- 激酶调节胰腺  $\beta$  细胞中胰岛素颗粒的胞吐), J Biol Chem, 2011. 286(6): 第 4216-25 页。

[0186] Elks, M. L., Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release(使用棕榈酸盐对大鼠胰岛进行长期表面灌流抑制葡萄糖刺激的胰岛素释放), Endocrinology, 1993. 133(1): 第 208-14 页。

[0187] Everts 等, Effects of a furan fatty acid and indoxyl sulfate on thyroid hormone uptake in cultured anterior pituitary cells(呋喃脂肪酸和硫酸吲哚酚对培养的垂体前叶细胞中甲状腺激素的摄取的影响), The American Physiological Society(1995)。

[0188] Hue, L. 和 H. Taegtmeyer, The Randle cycle revisited: a new head for an old hat(重新审视葡萄糖-脂肪酸循环: 旧语新思), Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. 297(3): 第 E578-91 页。

[0189] Humphrey, R. K. 等, Glucose regulates steady-state levels of PDX1 via the reciprocal actions of GSK3 and AKT kinases(葡萄糖经由 GSK3 和 AKT 激酶的互逆作用调节 PDX1 的稳态水平), J Biol Chem, 2010. 285(5): 第 3406-16 页。

[0190] Joseph, J. W. 等, Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression(游离脂肪酸诱导的  $\beta$ - 细胞缺陷依赖于解偶联蛋白 2 表达), J Biol Chem, 2004. 279(49): 第 51049-56 页。

[0191] Kahn, S. E., The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes(胰岛素抵抗和  $\beta$ - 细胞功能障碍对 2 型糖尿病的病理生理学的相对影响), Diabetologia, 2003. 46(1): 第 3-19 页。

[0192] Kamoda, T. 等, The serum levels of proinsulin and their relationship with IGFBP-1 in obese children(肥胖儿童的胰岛素原的血清水平以及它们与 IGFBP-1 的关系), Diabetes Obes Metab, 2006. 8(2): 第 192-6 页。

[0193] Kaneto, H. 等, PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function(PDX-1 和 MafA 在胰腺  $\beta$ - 细胞分化和成熟  $\beta$ - 细胞功能的维持中起关键性的作用), Endocr J, 2008. 55(2): 第 235-52 页。

[0194] Kashemsant, N. 和 C. B. Chan, Impact of uncoupling protein-2 overexpression on proinsulin processing(解偶联蛋白-2 过表达对胰岛素原加工的影响), J Mol Endocrinol, 2006. 37(3): 第 517-26 页。

[0195] Kawamori, D. 等, Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase(氧化应激经由激活 c-Jun NH(2)- 末端激酶诱导胰腺转录因子 PDX-1 的核-胞质易位), Diabetes, 2003. 52(12): 第 2896-904 页。

[0196] Kawamori, D. 等, The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation (叉头转录因子 Foxo1 经由它的细胞内易位跨接 JNK 通路和转录因子 PDX-1), *J Biol Chem*, 2006. 281(2): 第 1091-8 页。

[0197] Kitamura, Y. I. 等, FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction (FoxO1 经由 NeuroD 和 MafA 诱导防止胰腺  $\beta$  细胞衰竭), *Cell Metab*, 2005. 2(3): 第 153-63 页。

[0198] Kuhl, C., Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management (妊娠期的胰岛素分泌和胰岛素抵抗与 GDM: 诊断和管理的启示), *Diabetes*, 1991. 40 增刊 2: 第 18-24 页。

[0199] Kutlu B. 等, Detailed transcriptome atlas of the pancreatic beta cell (胰腺  $\beta$  细胞的详细的转录组图谱), *BMC Med Genomics*, 2009. 2: 第 3 页。

[0200] Lee, S. C., C. A. Robson-Doucette 以及 M. B. Wheeler, Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin (解偶联蛋白 2 调节胰岛中活性氧簇的形成并且影响对链脲佐菌素的致糖尿病作用的敏感性), *J Endocrinol*, 2009. 203(1): 第 33-43 页。

[0201] Lee, E. 等, Antioxidant treatment may protect pancreatic beta cells through the attenuation of islet fibrosis in an animal model of type 2 diabetes (在 2 型糖尿病动物模型中抗氧化剂处理可以经由减轻胰岛纤维化来保护胰腺  $\beta$  细胞), *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 414(2): 第 397-402 页。

[0202] Lim CF, Stockigt JR, Curtis AJ, Wynne KN, Barlow JW 以及 Topliss DJ. A naturally occurring furan fatty acid enhances drug inhibition of thyroxine binding in serum (天然存在的呋喃脂肪酸增强药物对血清中甲状腺素结合的抑制作用), *Metabolism* (1993). 42(11): 1468-74。

[0203] Liu, Y. 等, Adiponectin Corrects High-Fat Diet-Induced Disturbances in Muscle Metabolomic Profile and Whole-Body Glucose Homeostasis (脂联素纠正高脂肪饮食诱发的肌肉代谢组谱和全身葡萄糖稳态的紊乱), *Diabetes*, 2012。

[0204] Mabuchi H 和 Nakahashi H. A major endogenous ligand substance involved in renal failure (涉及肾衰竭的主要内源性配体物质), *Nephron* (1988). 49(4): 277-80。

[0205] Mason, R. M., Studies on the effect of probenecid (benemid) in gout (有关丙磺舒 (羟苯磺丙胺) 在痛风中的作用的研究), *Ann Rheum Dis*, 1954. 13(2): 第 120-30 页。

[0206] Mishra R. 等, Adipose differentiation-related protein and regulators of lipid homeostasis identified by gene expression profiling in the murine db/db diabetic kidney (在鼠 db/db 糖尿病性肾脏中通过基因表达谱分析所鉴定的脂肪分化相关蛋白和脂质稳态调节因子), *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 286(5): 第 F913-21 页。

[0207] Miyamoto, Y. 等, A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a

radical intermediate(尿毒症毒素 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸经由产生自由基中间体诱导对近端小管细胞的细胞损伤), *Biochem Pharmacol*, 2012. 84(9): 第 1207-14 页。

[0208] More V.R. 等, Severe diabetes and leptin resistance cause differential hepatic and renal transporter expression in mice(在 小 鼠 中 严 重 的 糖 尿 病 和 瘦 素 抵 抗 引 起 不 同 的 肝 脏 和 肾 脏 转 运 蛋 白 表 达), *Comp Hepatol*, 2012. 11(1): 第 1 页。

[0209] Poitout, V. 和 R.P. Robertson, Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction(糖脂毒性: 营养物过量 and  $\beta$ -细胞功能障碍), *Endocr Rev*, 2008. 29(3): 第 351-66 页。

[0210] Niwa T, Aiuchi T, Nakaya K, Emoto Y, Miyazaki T 以及 Maeda K. Inhibition of mitochondrial respiration by furancarboxylic acid accumulated in uremic serum in its albumin-bound and non-dialyzable form(在尿毒症血清中以白蛋白结合形式和非可透析形式积聚的呋喃羧酸对线粒体呼吸的抑制作用), *Clin Nephrol*(1993). 39(2); 92-96。

[0211] Prentki, M. 和 C.J. Nolan, Islet beta cell failure in type 2 diabetes(2 型糖尿病中的胰岛  $\beta$  细胞衰竭), *J Clin Invest*, 2006. 116(7): 第 1802-12 页。

[0212] Retnakaran, R. 等, Beta-cell function declines within the first year postpartum in women with recent glucose intolerance in pregnancy(在妊娠期中患有近期葡萄糖不耐症的女性在产后第一年  $\beta$ -细胞功能下降), *Diabetes Care*, 2010. 33(8): 第 1798-804 页。

[0213] Robertson, R.P., Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes(长期氧化应激作为糖尿病中胰岛  $\beta$  细胞中葡萄糖毒性的中央机制), *J Biol Chem*, 2004. 279(41): 第 42351-4 页。

[0214] Robson-Doucette, C.A. 等, Beta-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion( $\beta$ -细胞解偶联蛋白 2 调节影响胰岛素和胰高血糖素这两者分泌的活性氧簇产生), *Diabetes*, 2011. 60(11): 第 2710-9 页。

[0215] Saadeh, M. 等, Reactive oxygen species stimulate insulin secretion in rat pancreatic islets: studies using mono-oleoyl-glycerol(活性氧簇刺激大鼠胰岛的胰岛素分泌: 使用单油酰基甘油进行研究), *PLoS One*, 2012. 7(1): 第 e30200 页。

[0216] Sassa T, Matsuno H, Niwa M, Kazawa O, Takeda N, Niwa T, Kumada T 以及 Uematsu T. Measurement of furancarboxylic acid, a candidate for uremic toxin, in human serum, hair, and sweat, and analysis of pharmacological actions in vitro(对人血清、毛发以及汗液中的呋喃羧酸——一种尿毒症毒素候选者的测量以及体外药理作用的分析), *Arch Toxicol*(2000)。

[0217] Sato M, Koyama M, Miyazaki T 以及 Niwa T. Reduced renal clearance of furancarboxylic acid, a major albumin-bound organic acid, in undialyzed uremic patients(在未透析的尿毒症患者中一种主要的白蛋白结合型有机酸呋喃羧酸的肾脏清除

率降低), Nephron(1996). 74(2) ;419-21。

[0218] Sekine, T., H. Miyazaki 以及 H. Endou, Molecular physiology of renal organic anion transporters(肾脏有机阴离子转运蛋白的分子生理学), Am J Physiol Renal Physiol, 2006. 290(2): 第 F251-61 页。

[0219] Sweet, D. H. 等, Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3(Oat3(Slc22a8)) knockout mice(有机阴离子转运蛋白 3(Oat3(Slc22a8)) 基因敲除小鼠的肾脏和脉络丛中的有机阴离子转运受损), J Biol Chem, 2002. 277(30): 第 26934-43 页。

[0220] Tsutsumi Y, Maruyama T, Takadate A, Goto M, Matsunaga H 以及 Otagiri M. Interaction between two dicarboxylate endogenous substances, bilirubin and an uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, on human serum albumin(两种二羧酸内源性物质, 即胆红素和尿毒症毒素 3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸与人血清白蛋白之间的相互作用), Pharmaceutical Research(1999). 16(6) ;916。

[0221] Wijendran, V. 等, Maternal plasma phospholipid polyunsaturated fatty acids in pregnancy with and without gestational diabetes mellitus: relations with maternal factors(在患有妊娠期糖尿病和未患妊娠期糖尿病的妊娠期中母体血浆磷脂多不饱和脂肪酸:与母体因子的关系), Am J Clin Nutr, 1999. 70(1): 第 53-61 页。

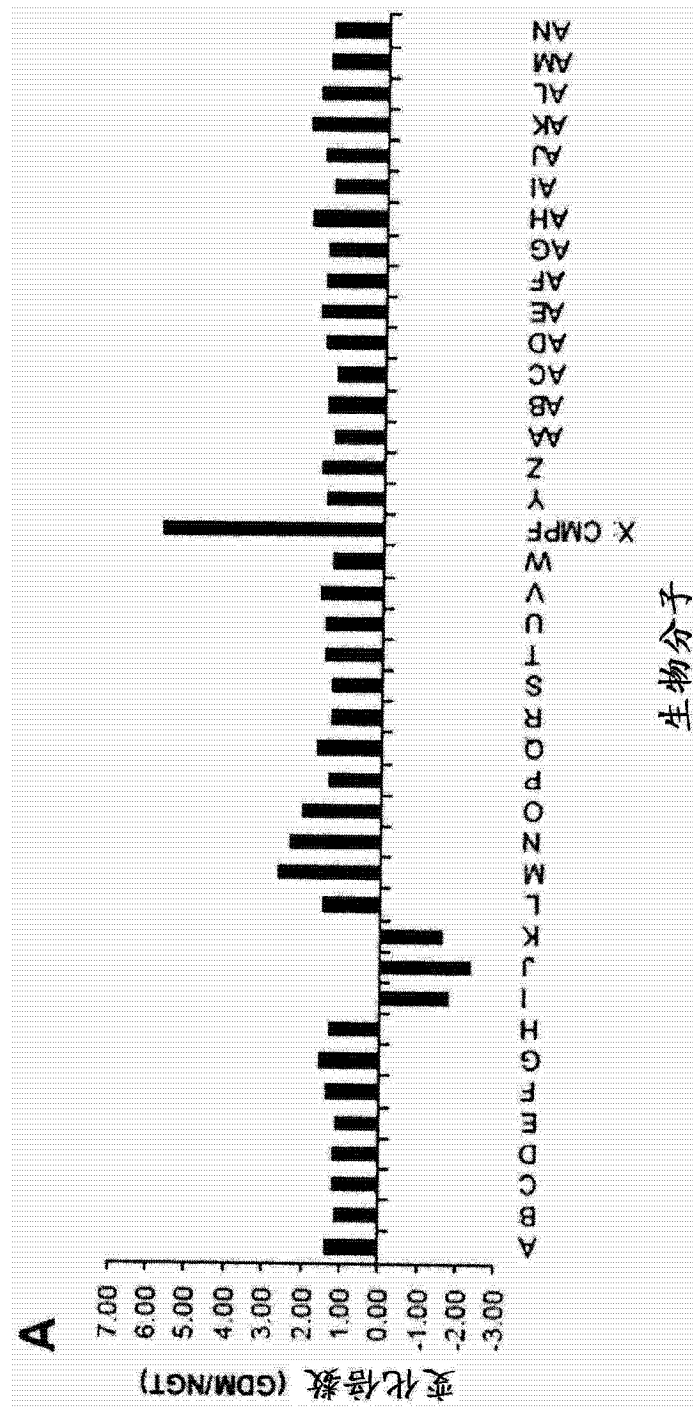


图 1

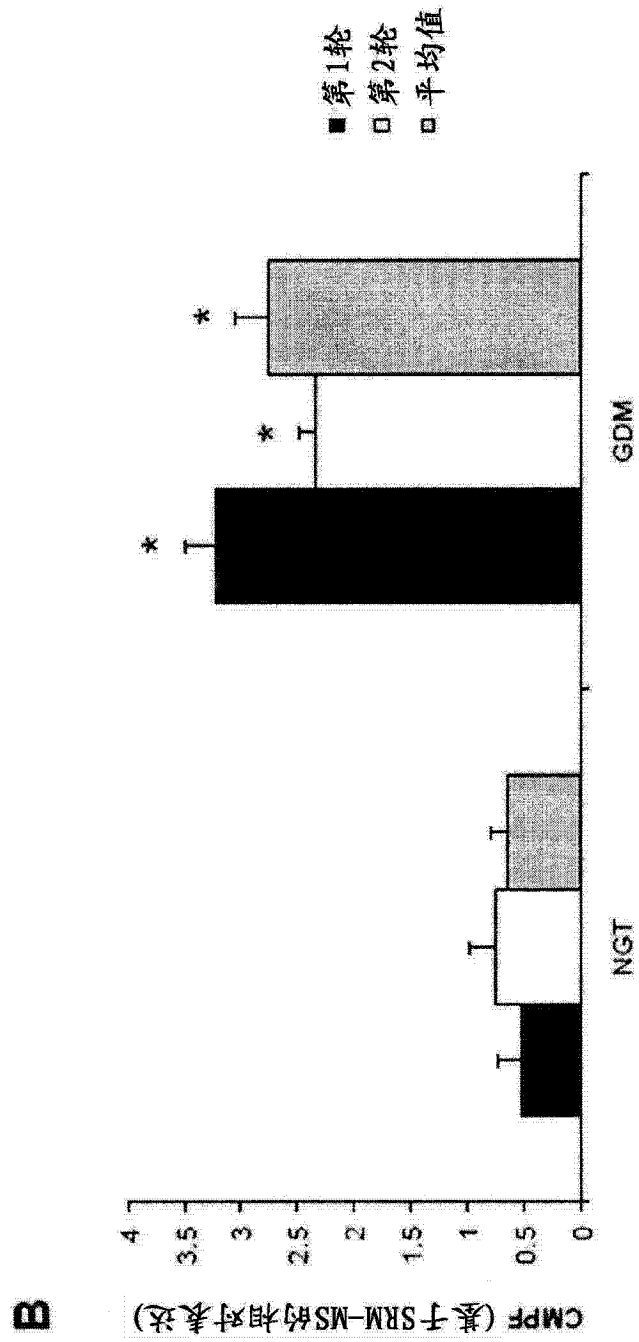


图1(续)

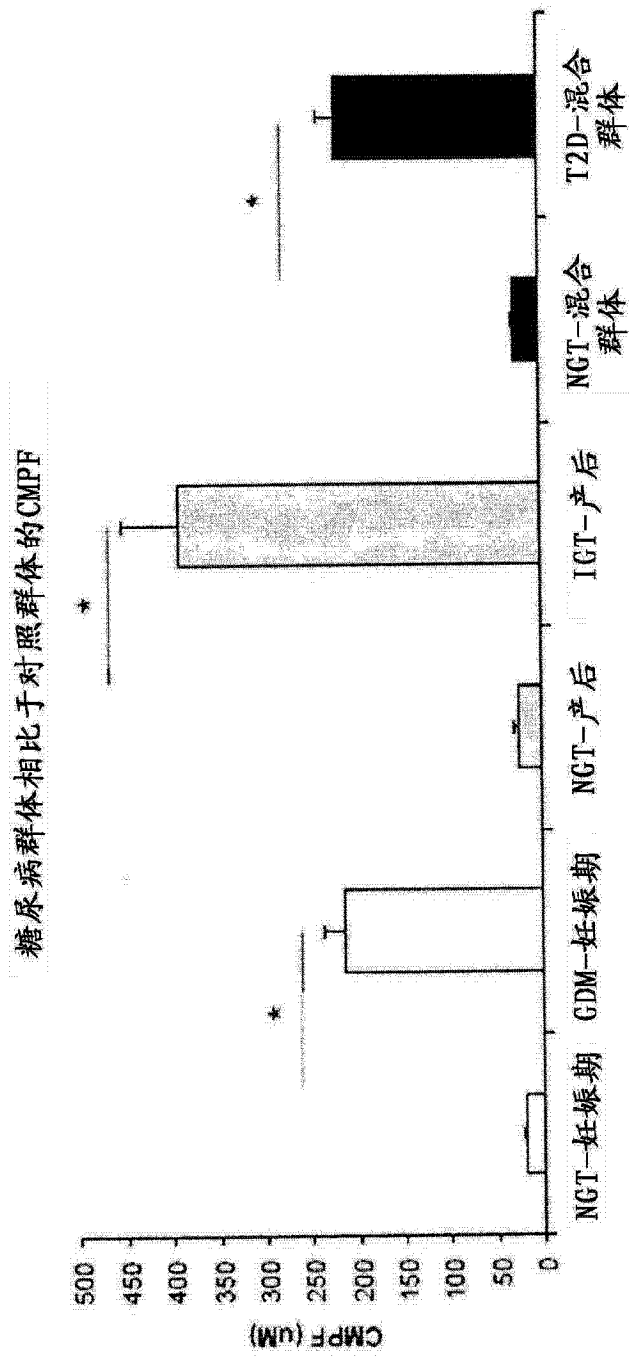


图 2

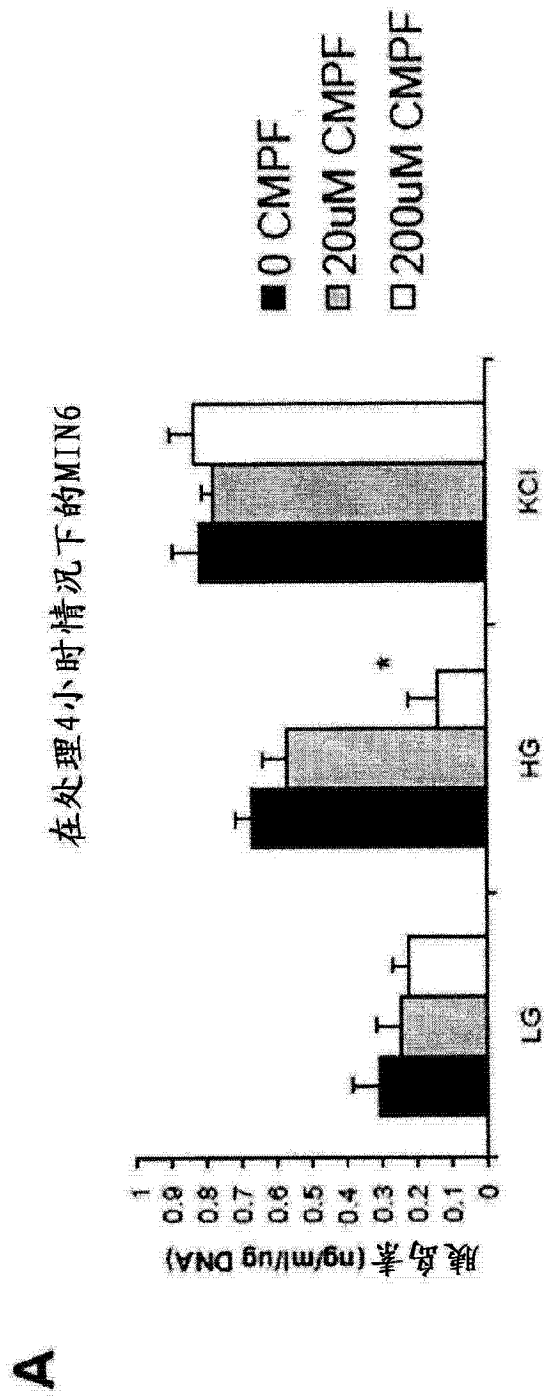


图 3

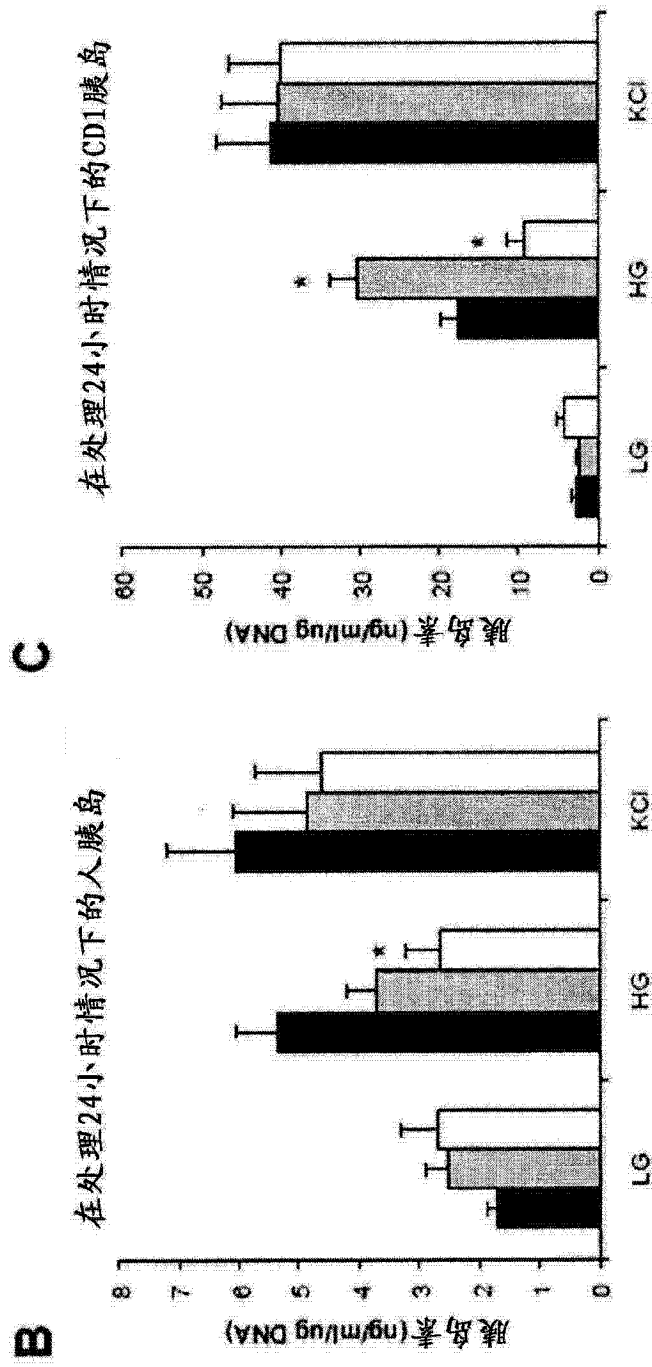


图3(续)

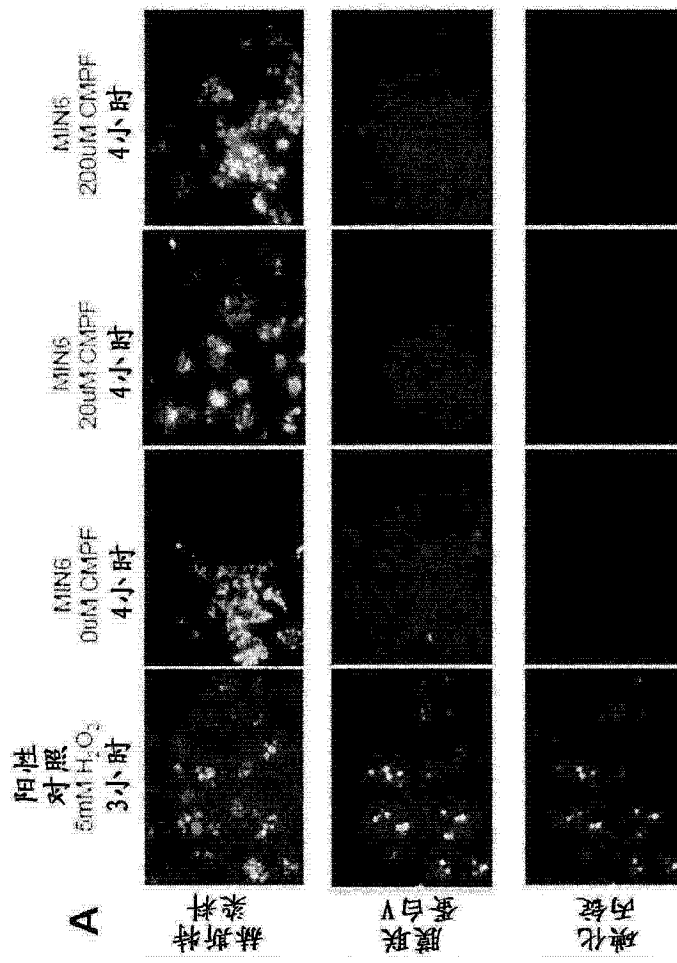


图 4

膜联蛋白V和碘化丙锭染色的被处理48小时的双重阳性的CD1膜岛细胞的百分比

**B**

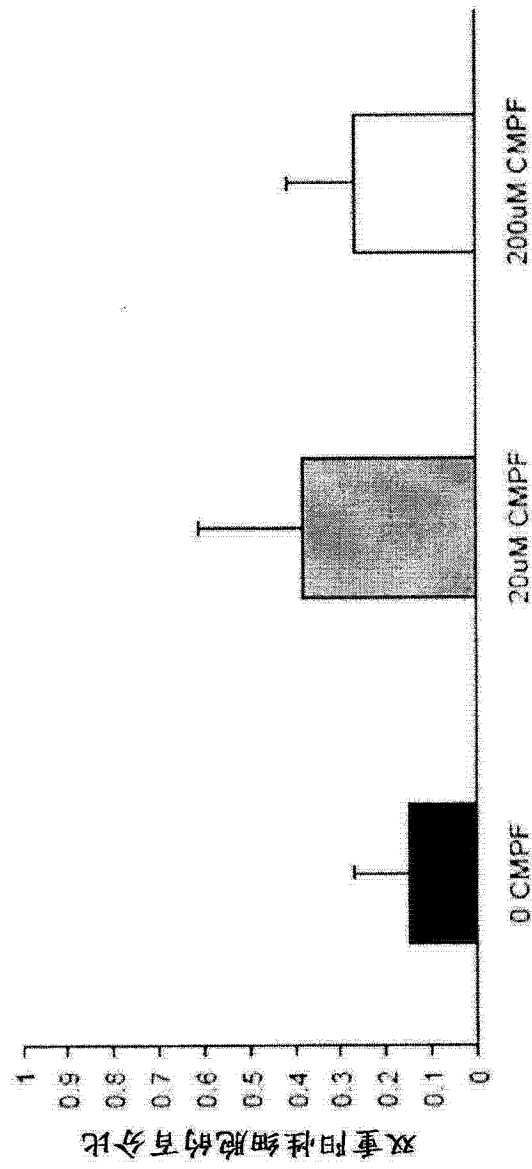


图4(续)

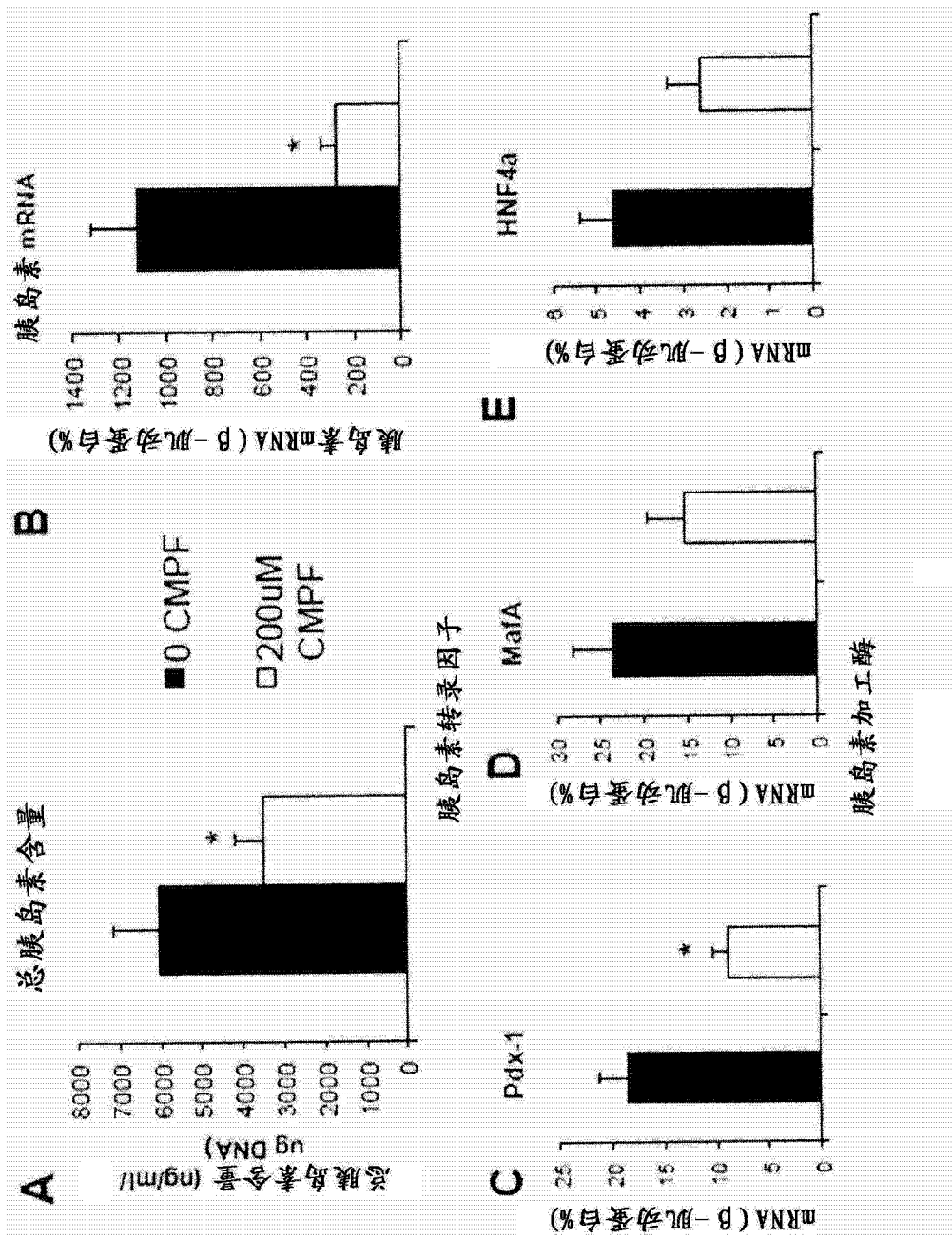


图 5

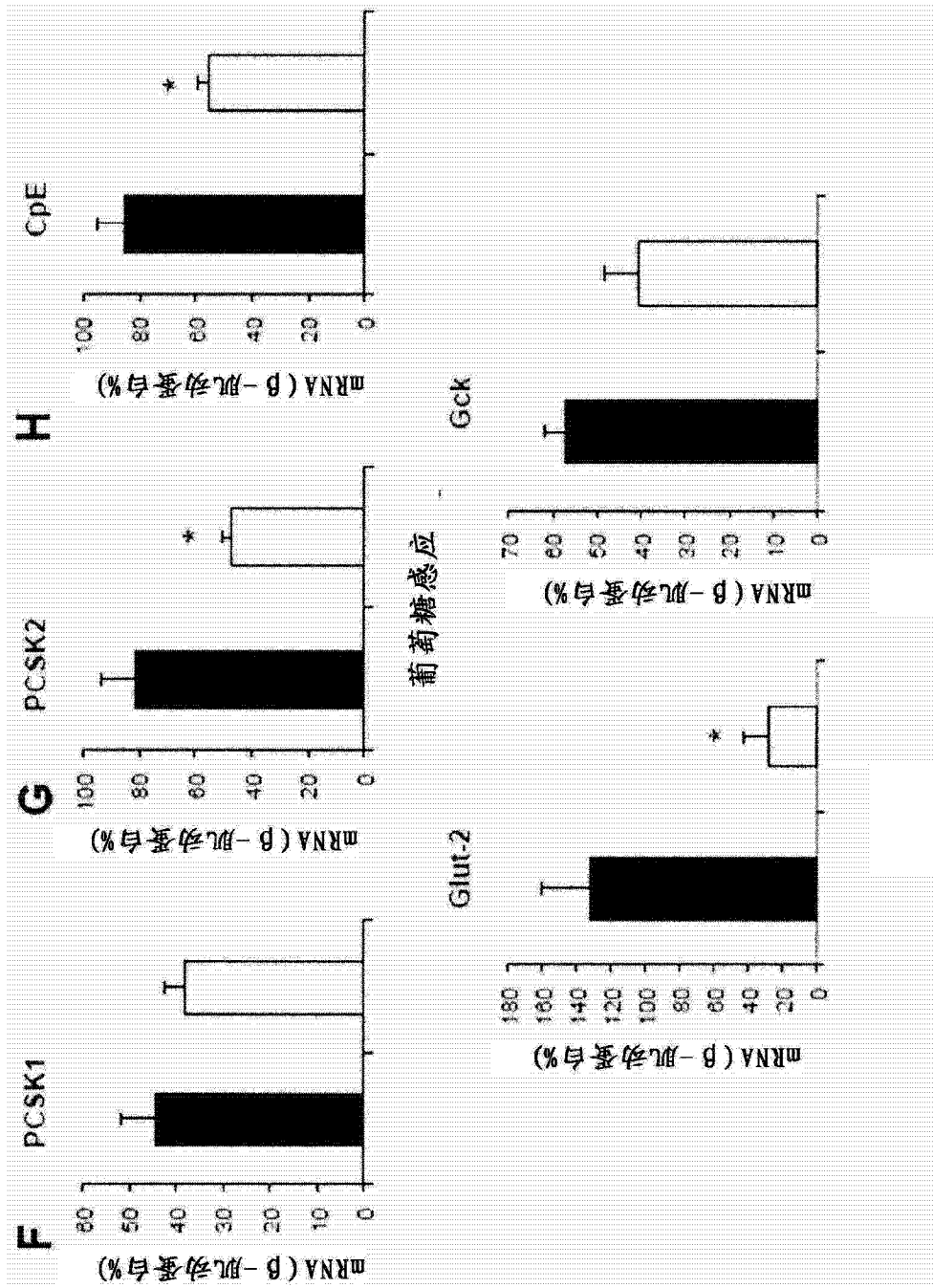


图5(续)

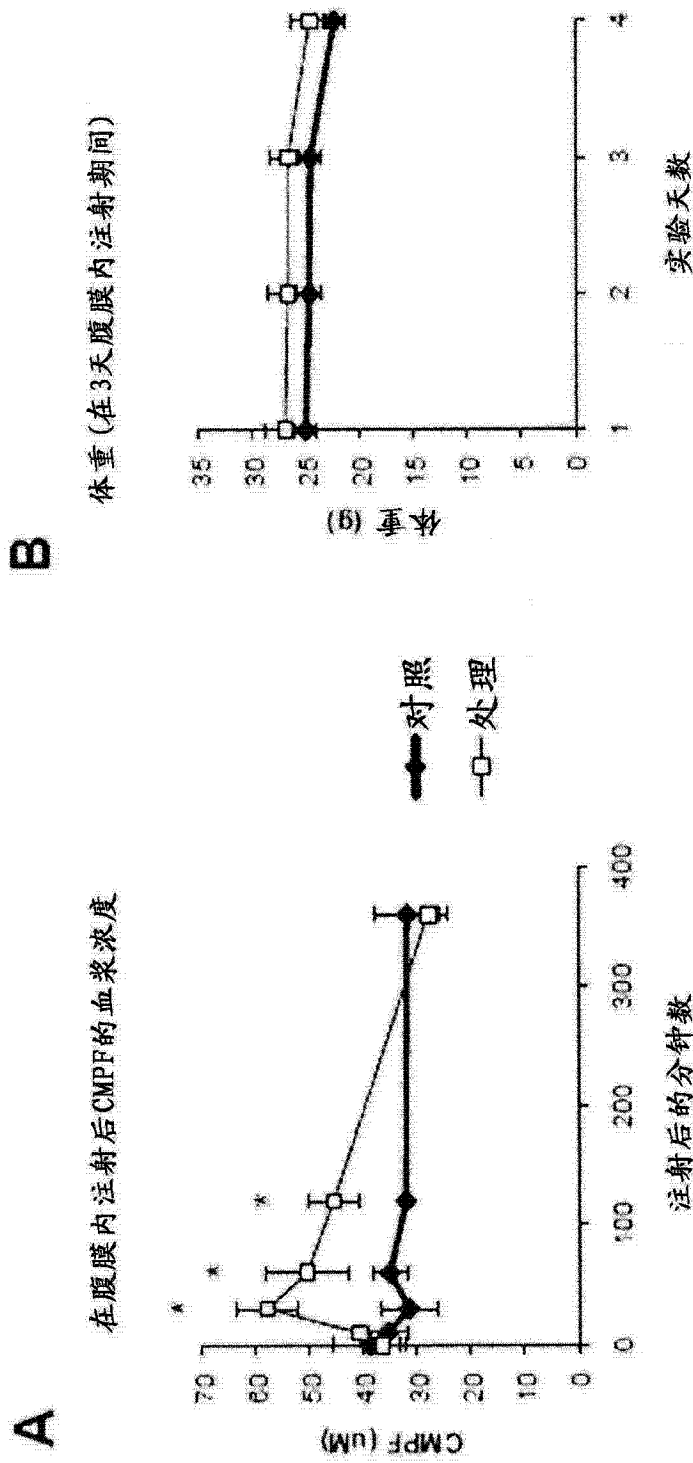


图 6

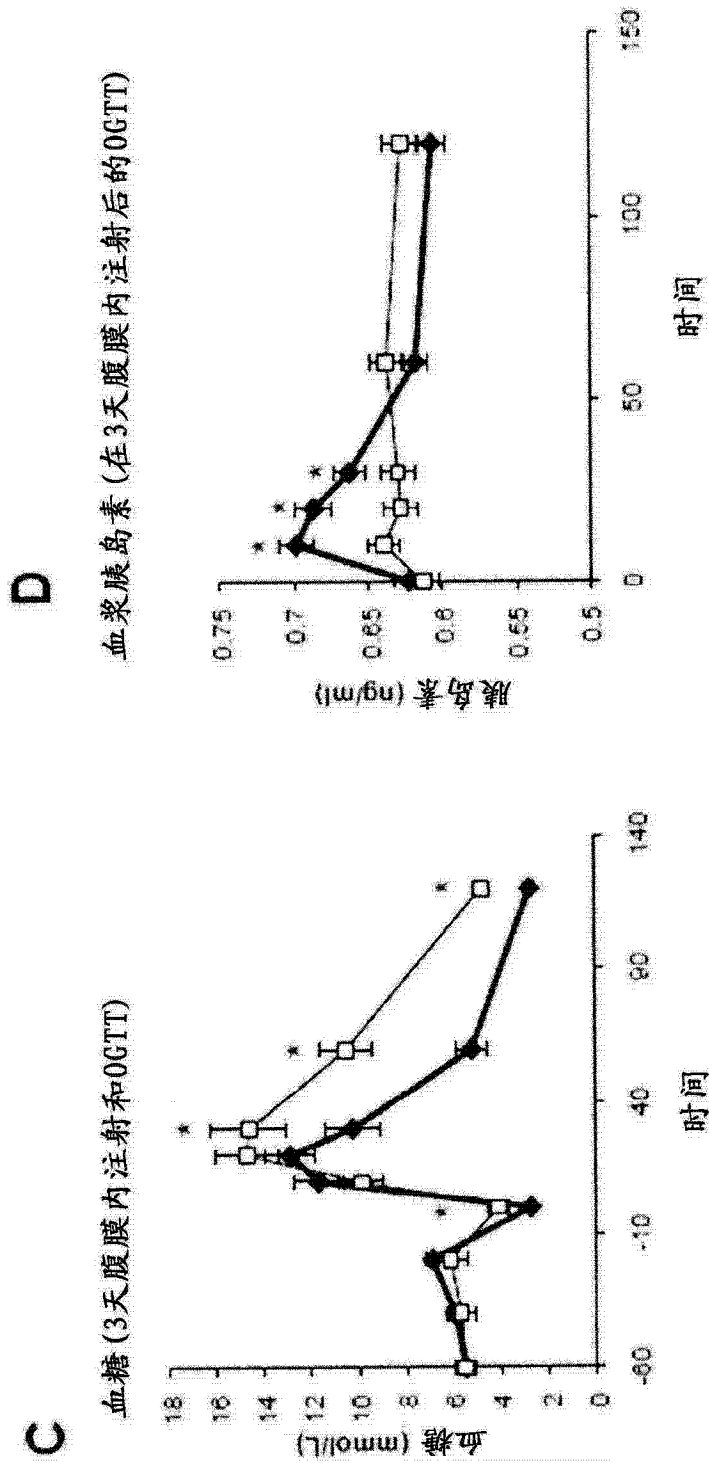


图6(续)

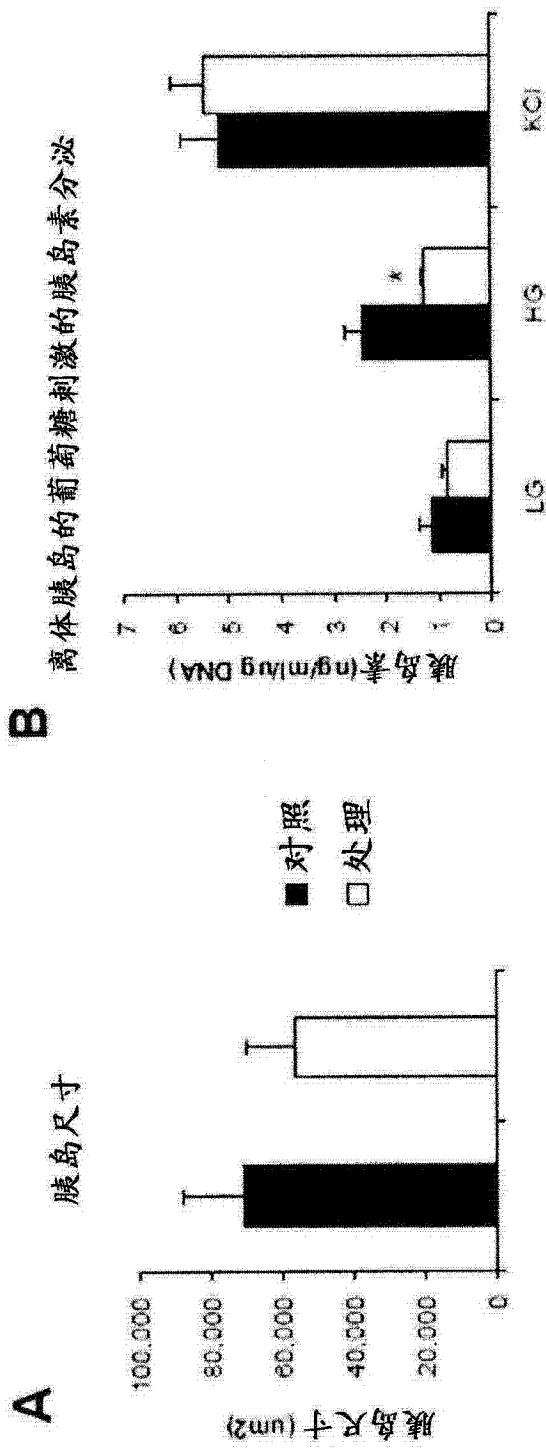


图7

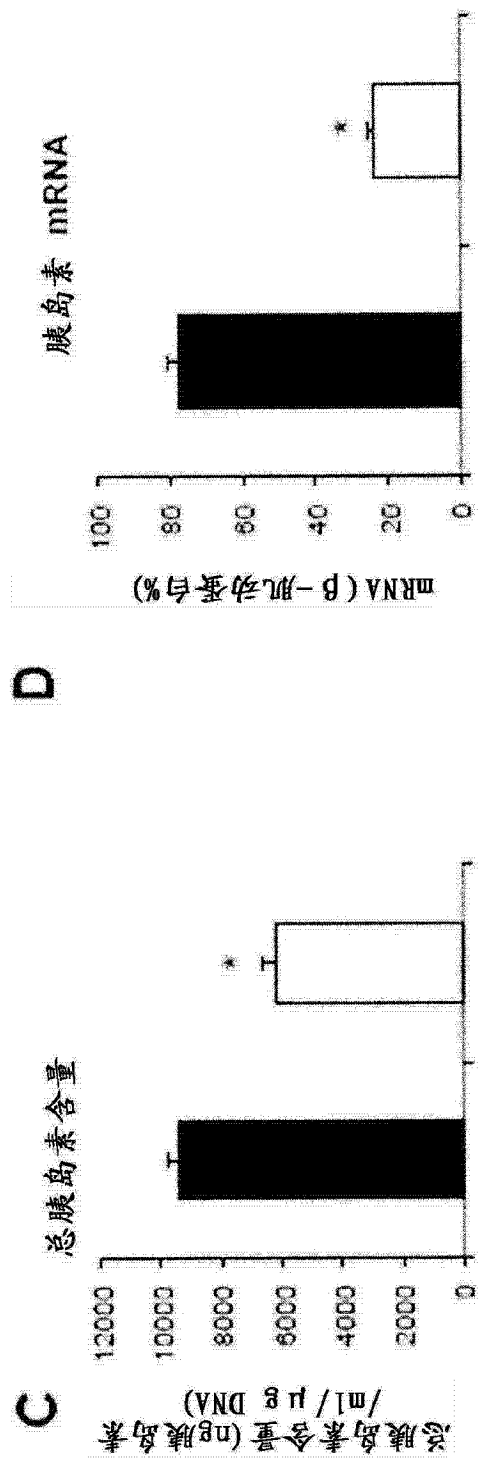


图7(续)

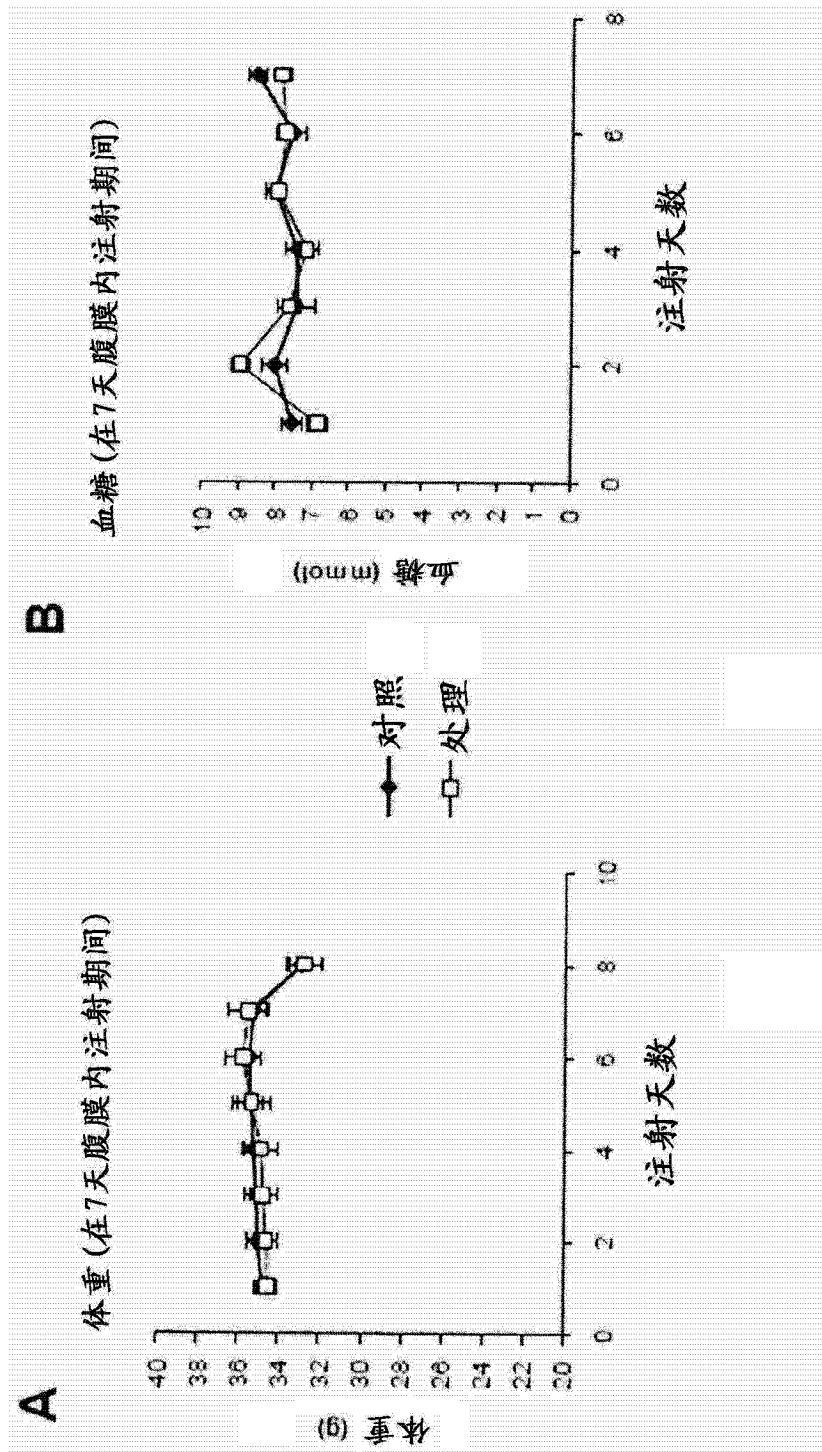


图 8

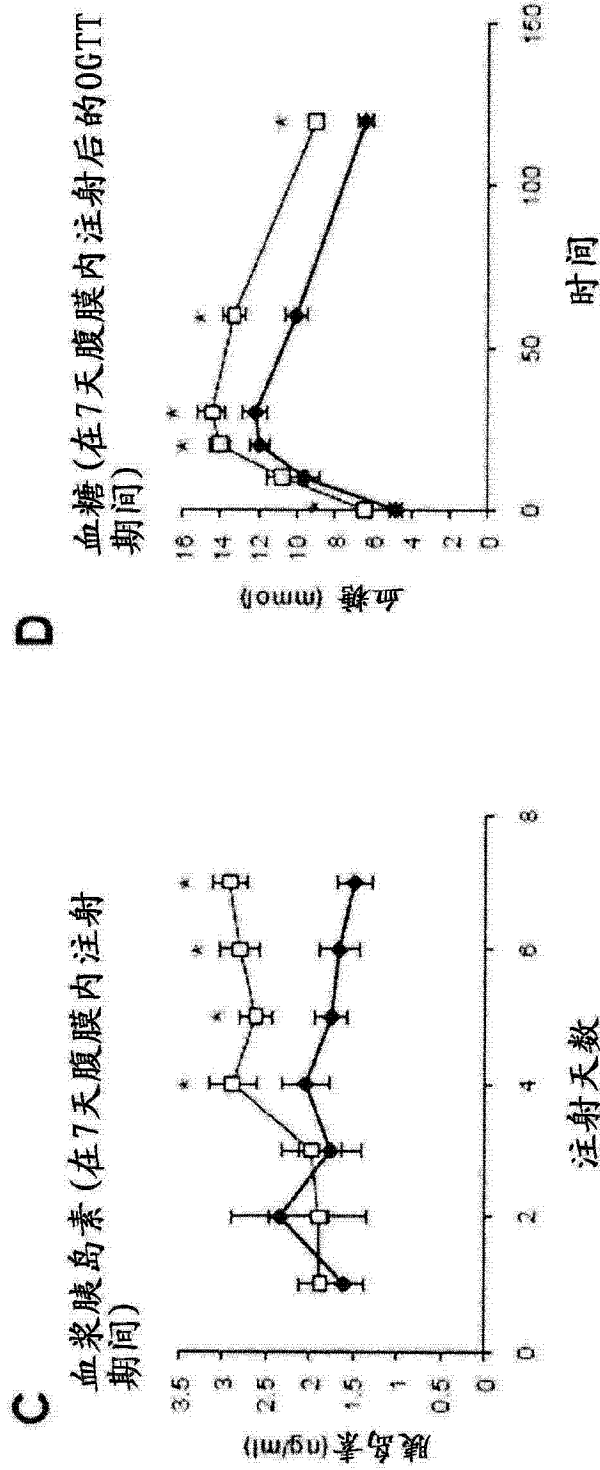


图8(续)

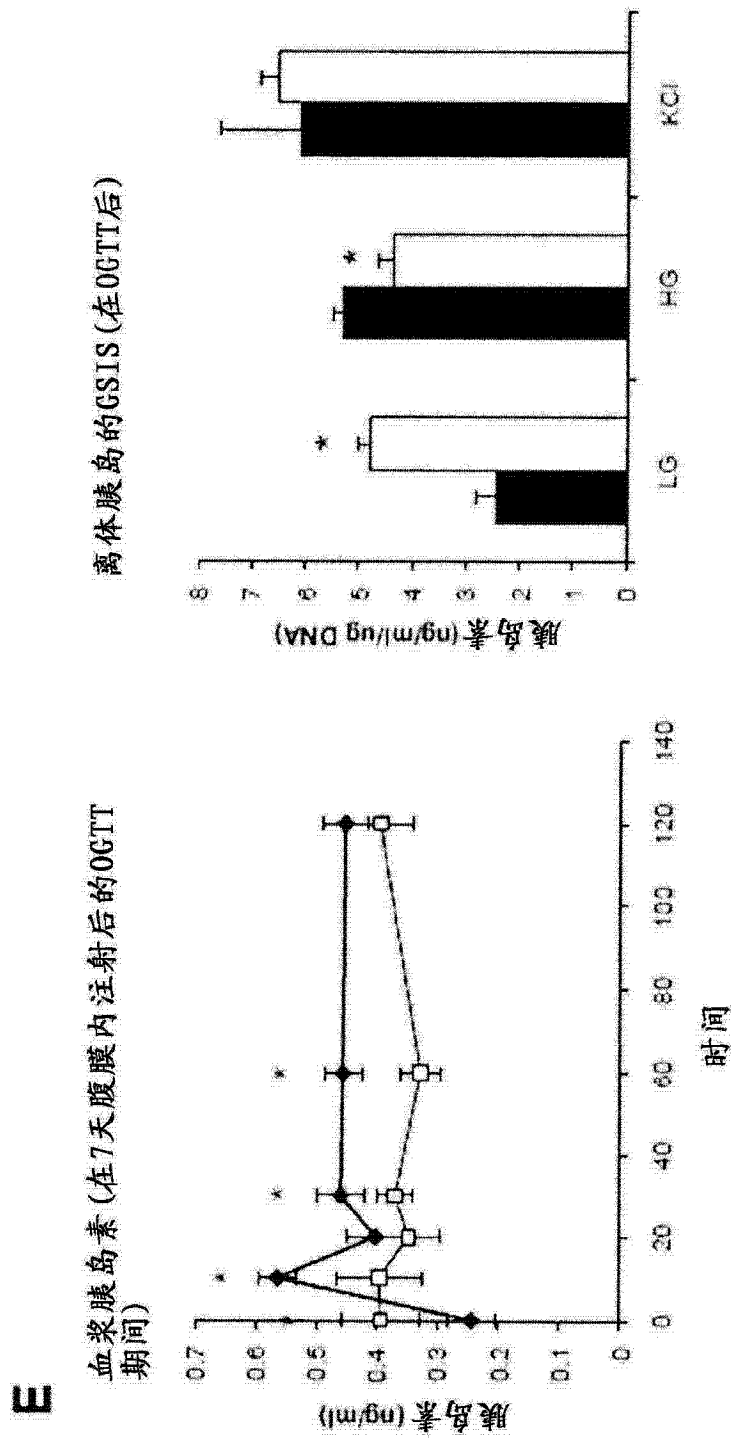
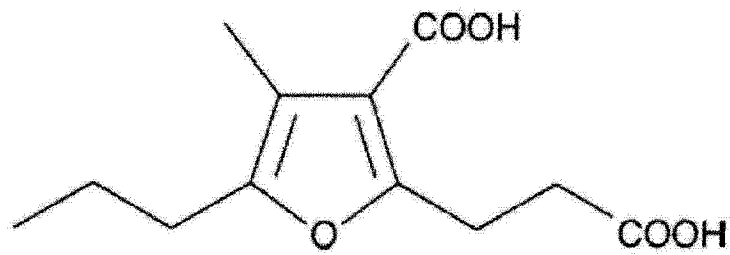


图8(续)



正式名称	3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-噻喃丙酸
分子式	$C_{12}H_{16}O_4$
式量	240.3
制剂	结晶固体
$\lambda_{max}$	260 nm

图 9

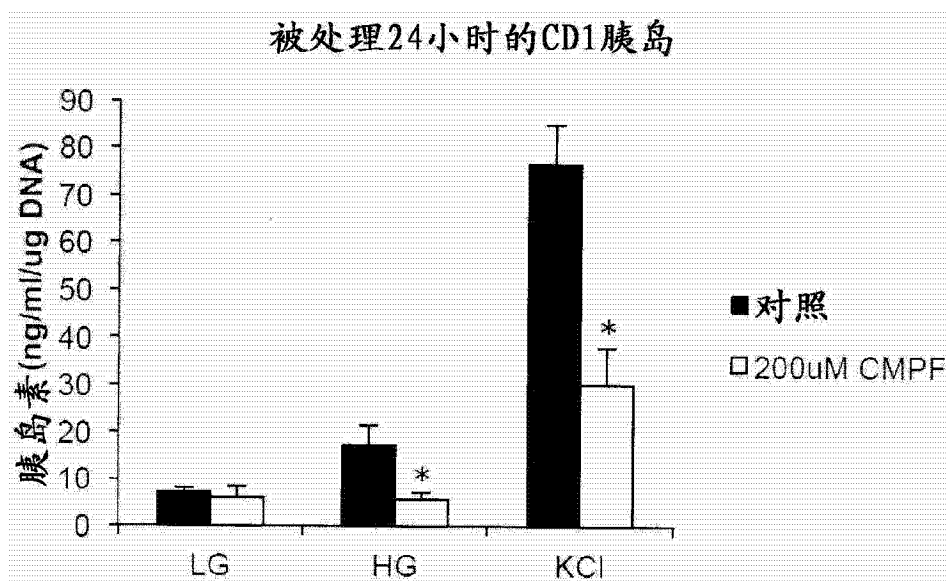


图 10

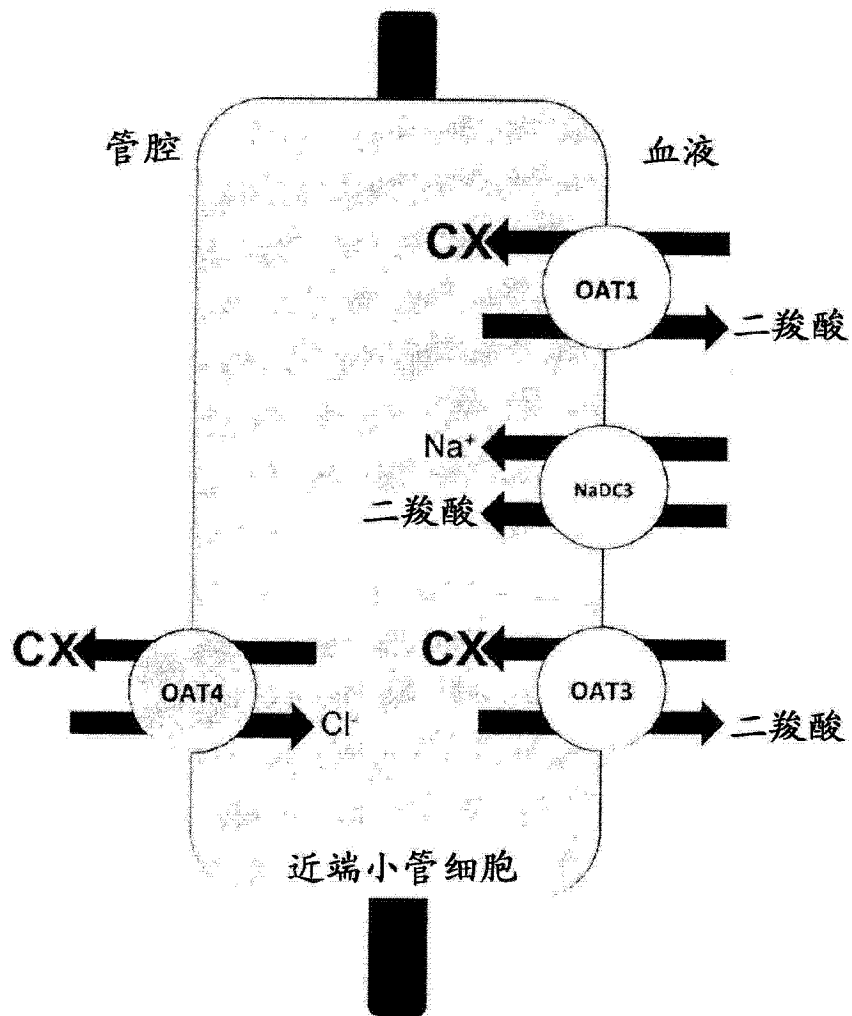


图 11

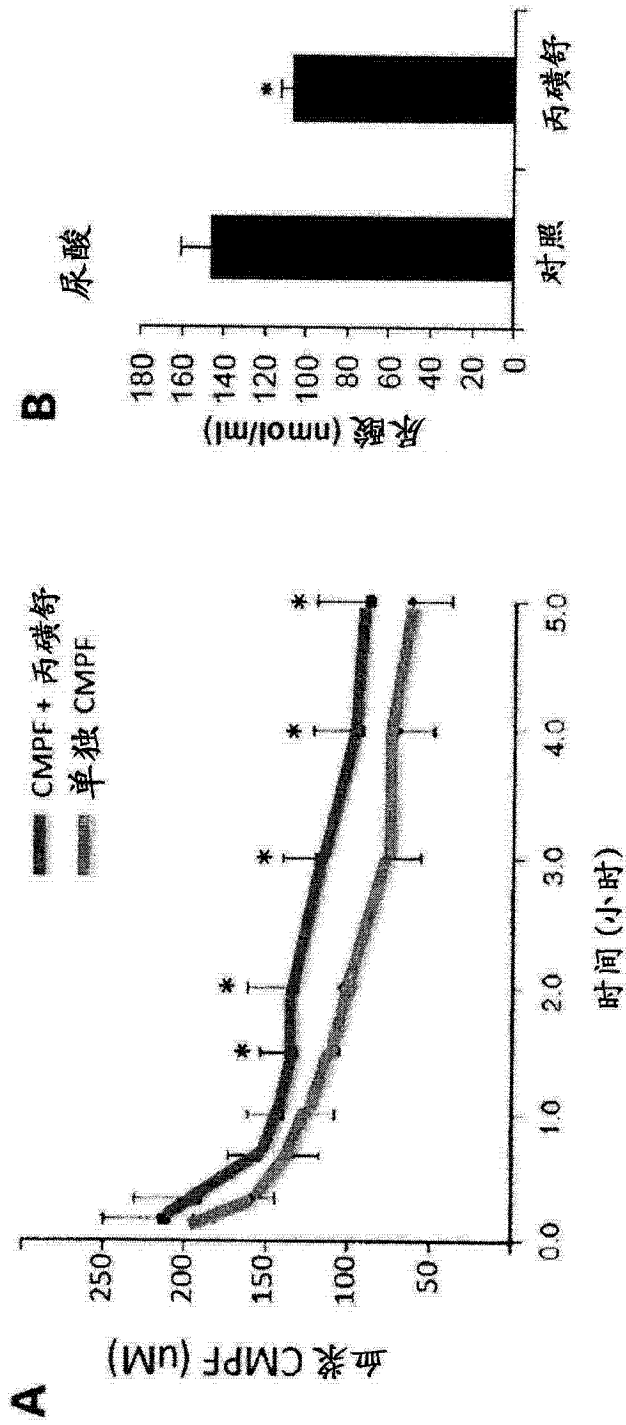


图 12

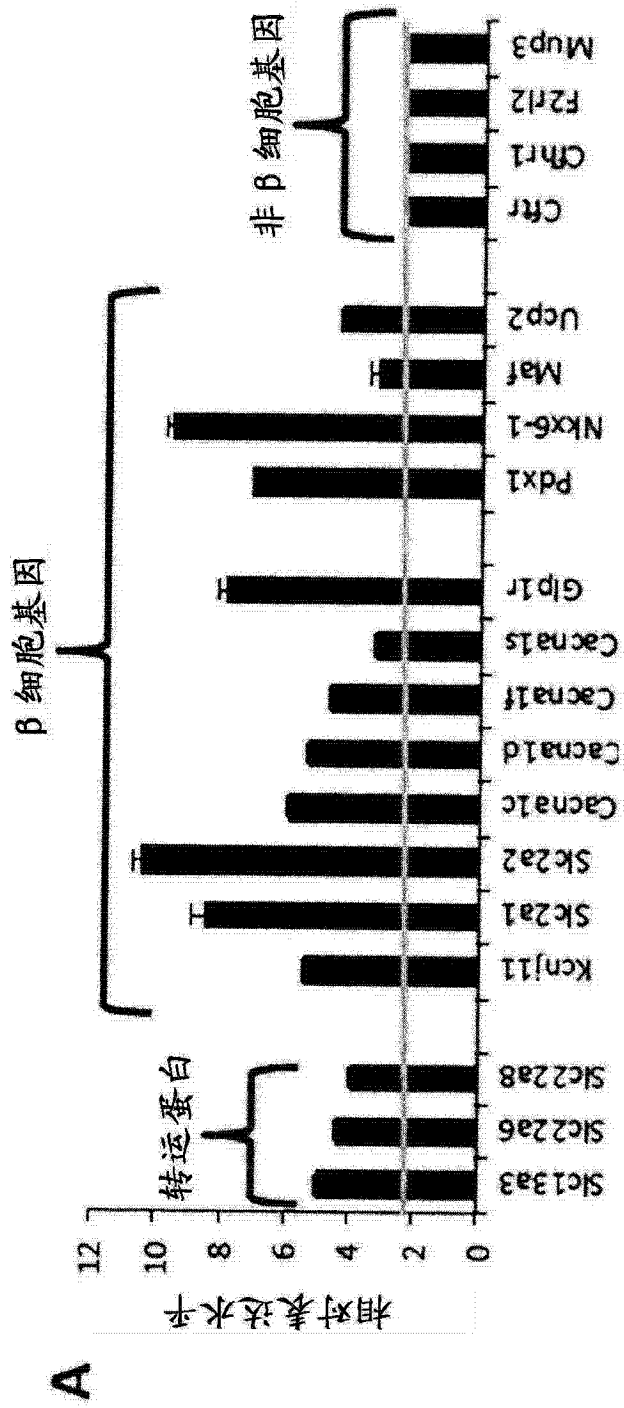


图 13

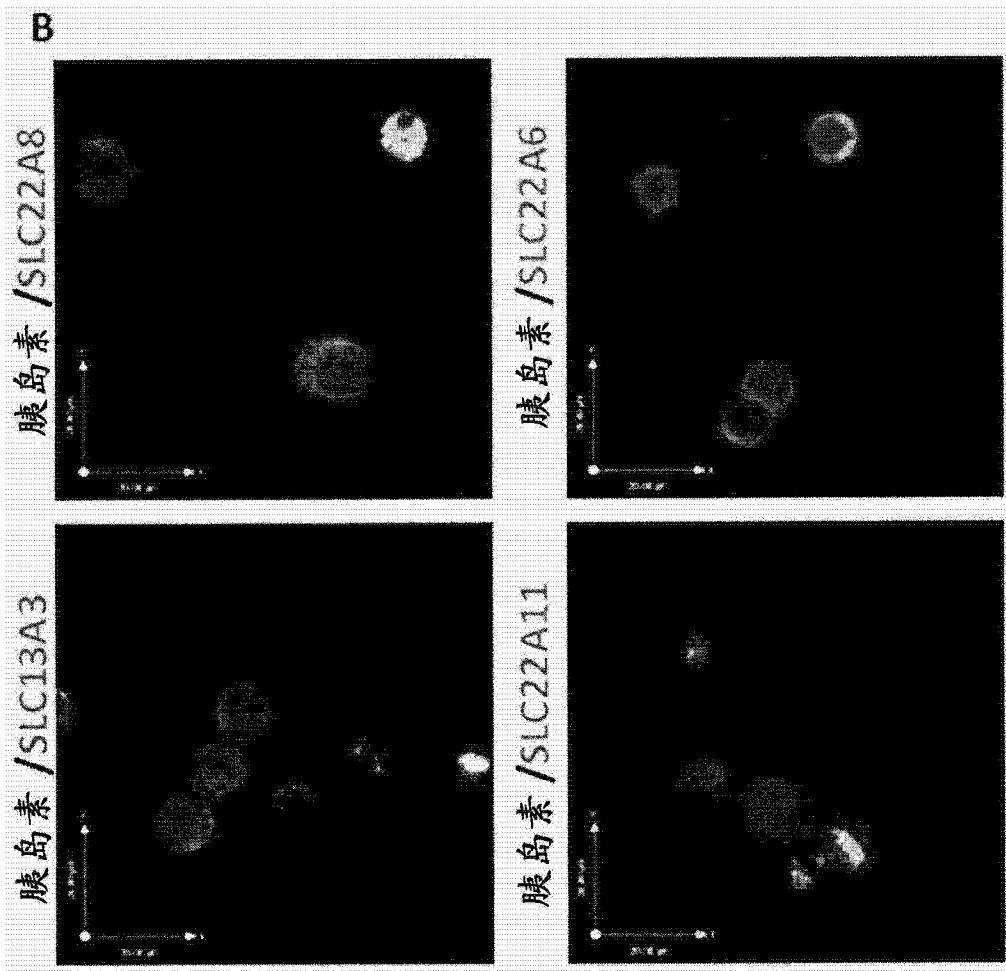


图 13(续)

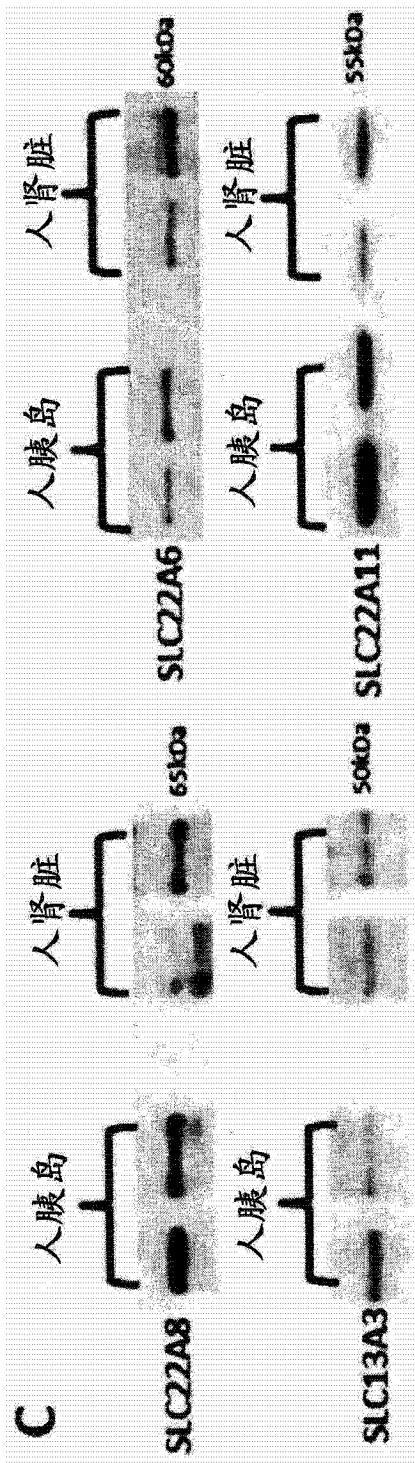


图 13(续)

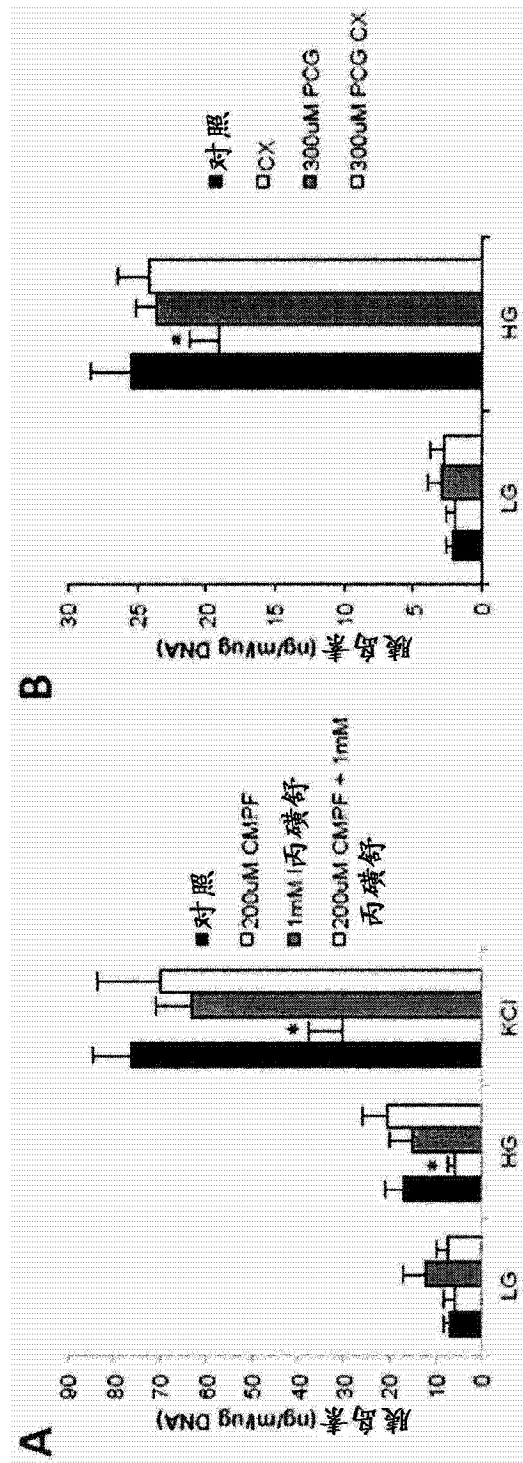


图 14

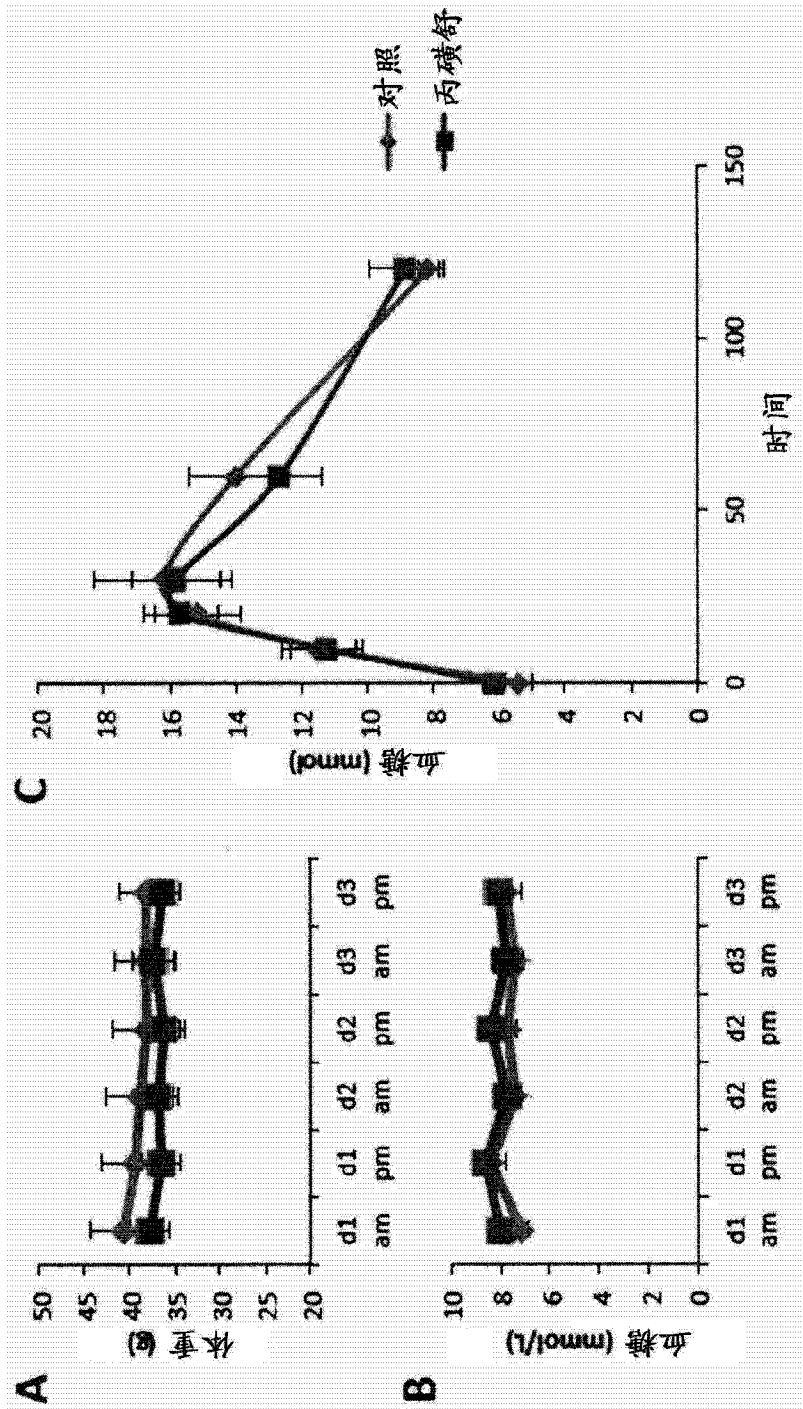


图 15

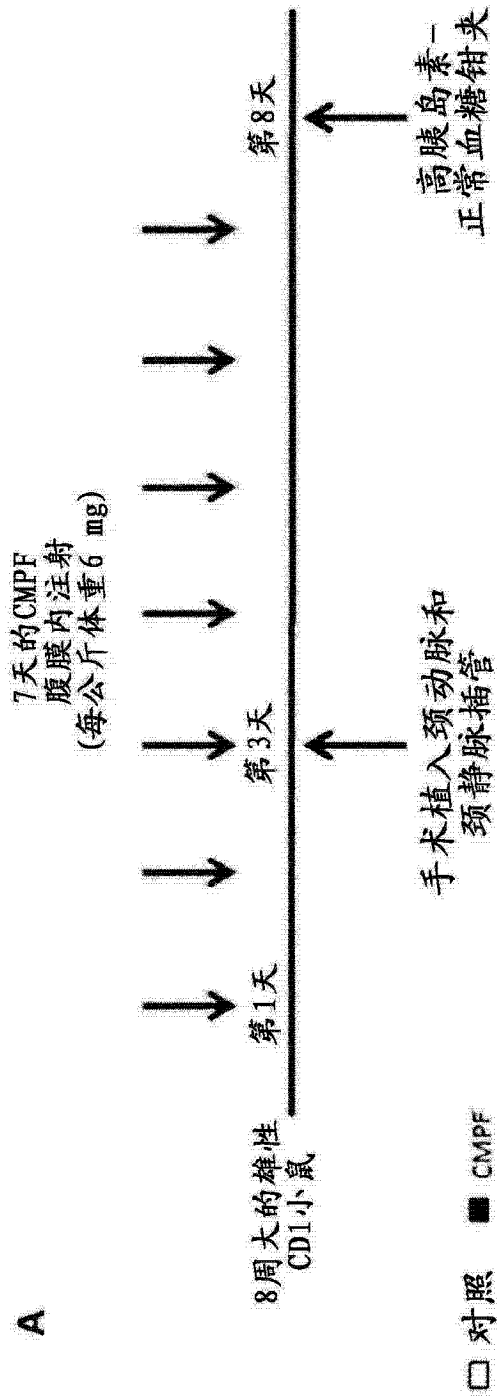


图 16

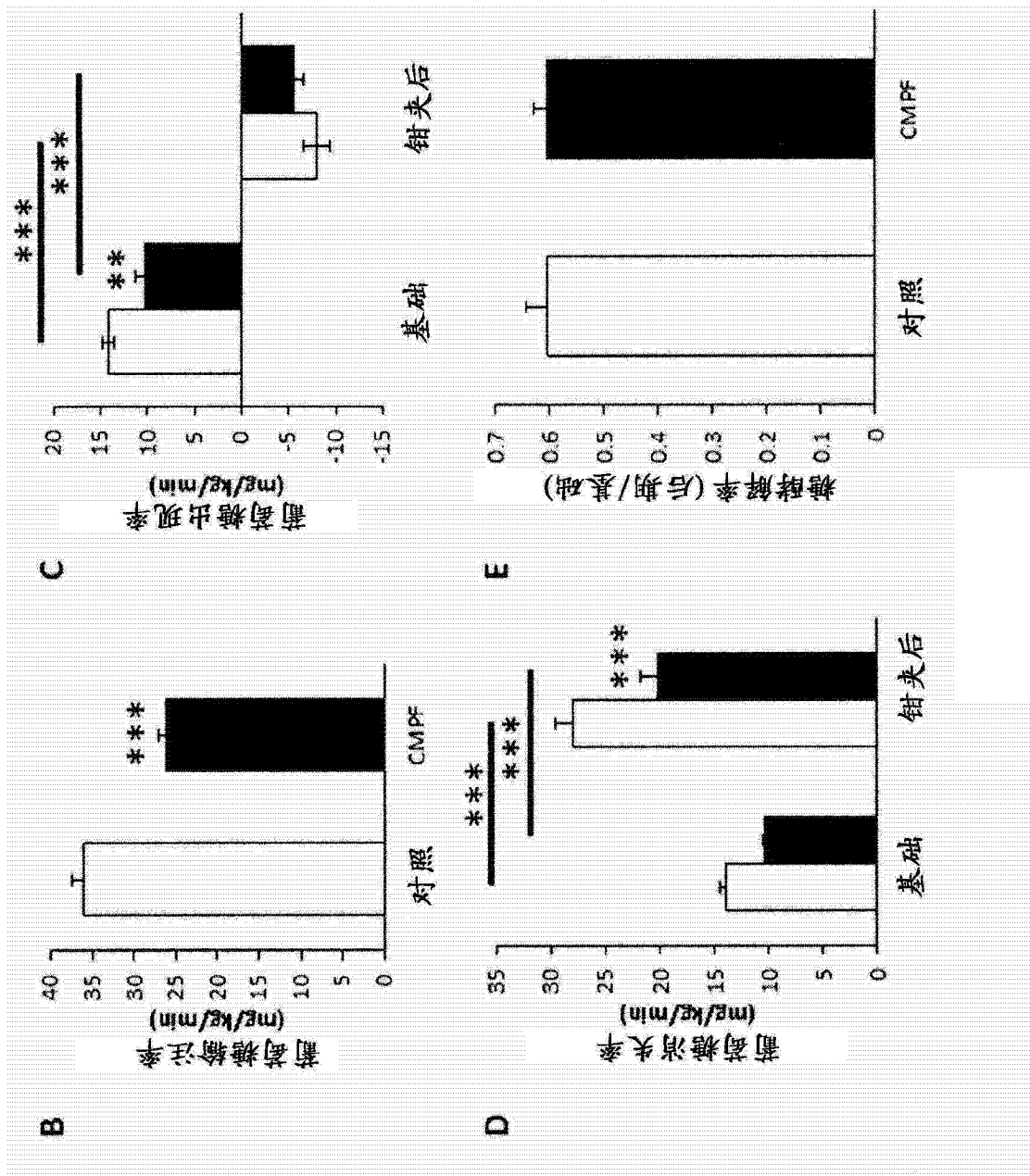


图 16(续)

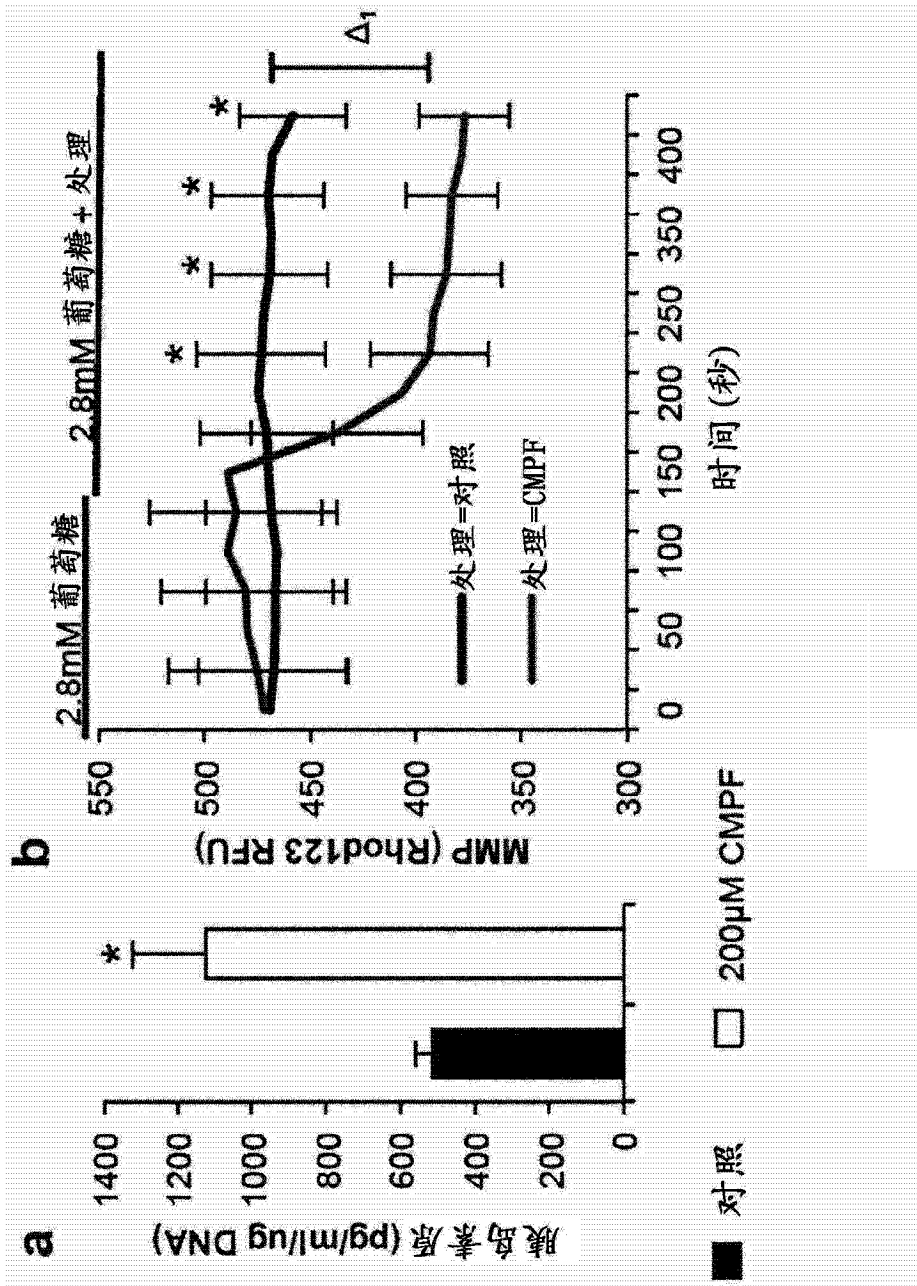


图 17

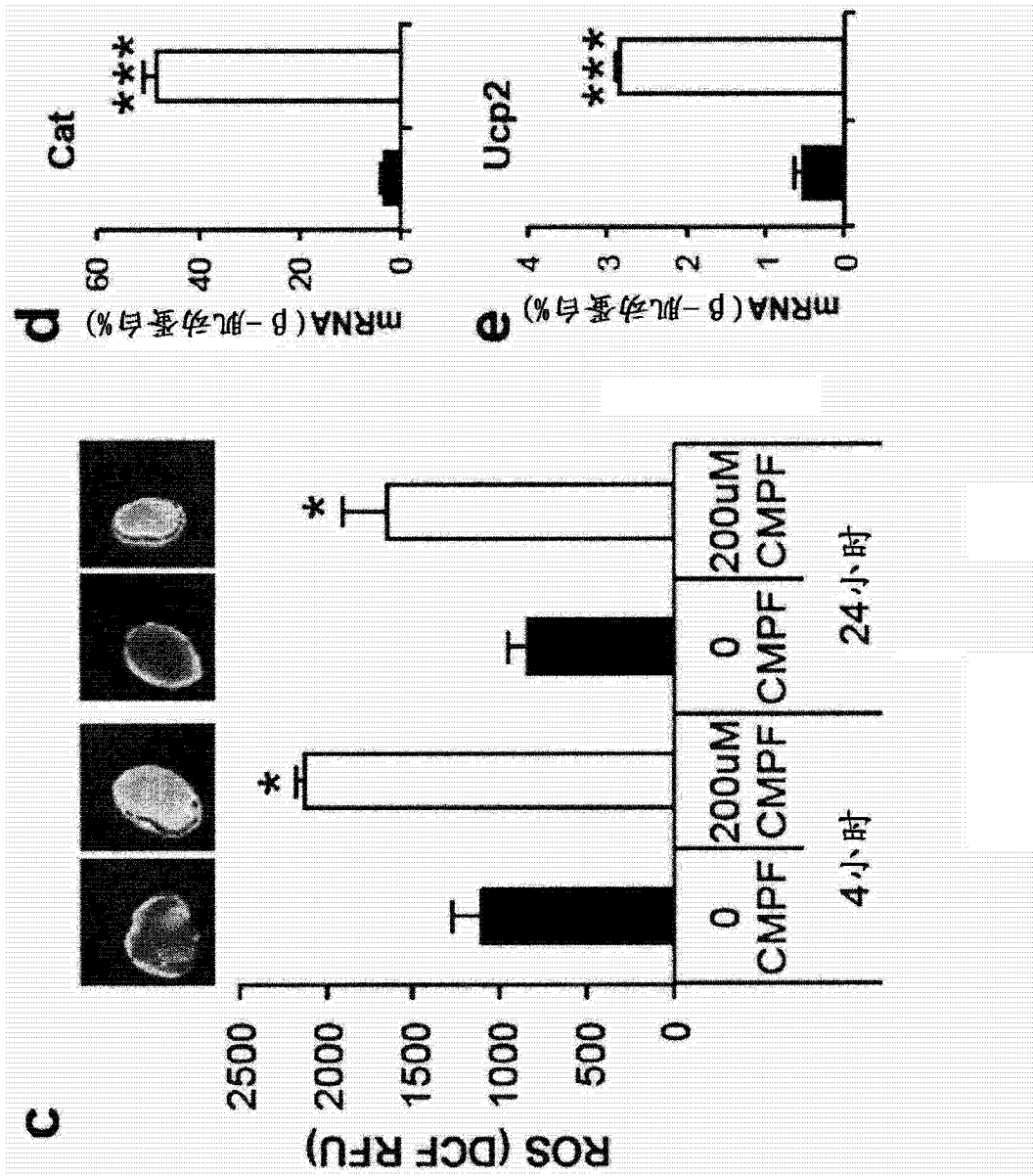


图 17(续)

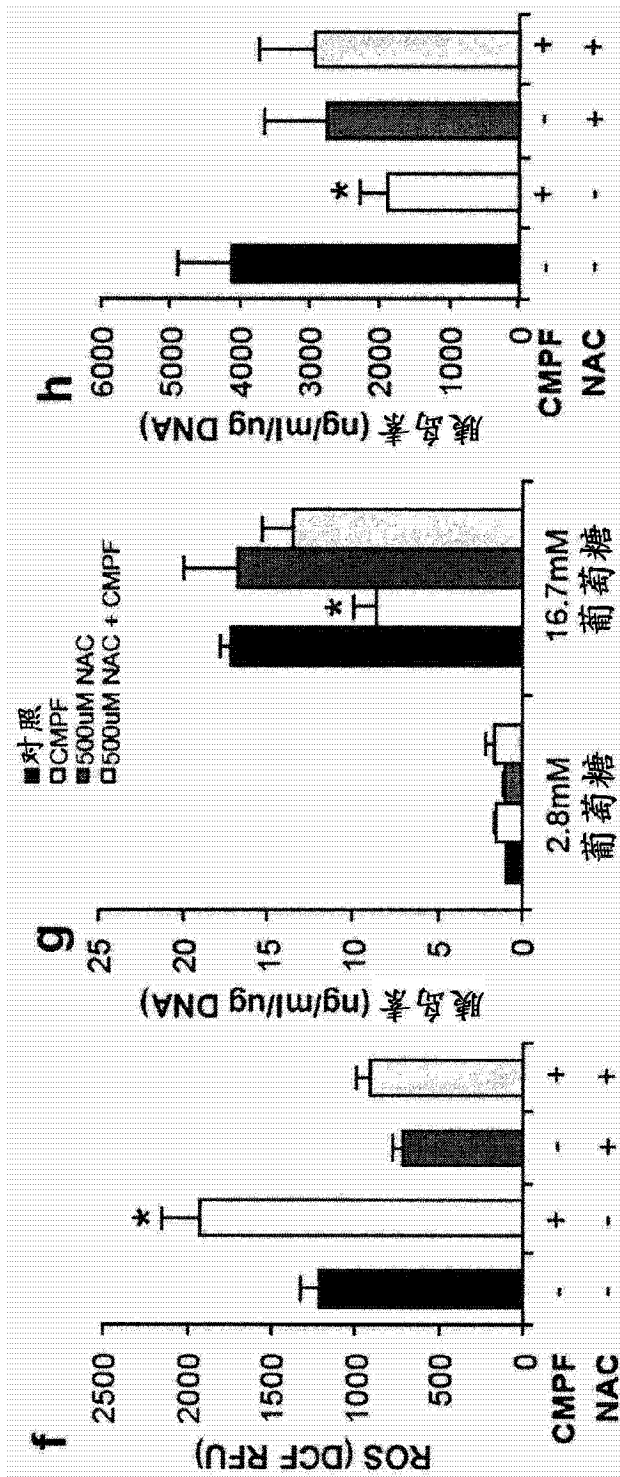


图 17(续)

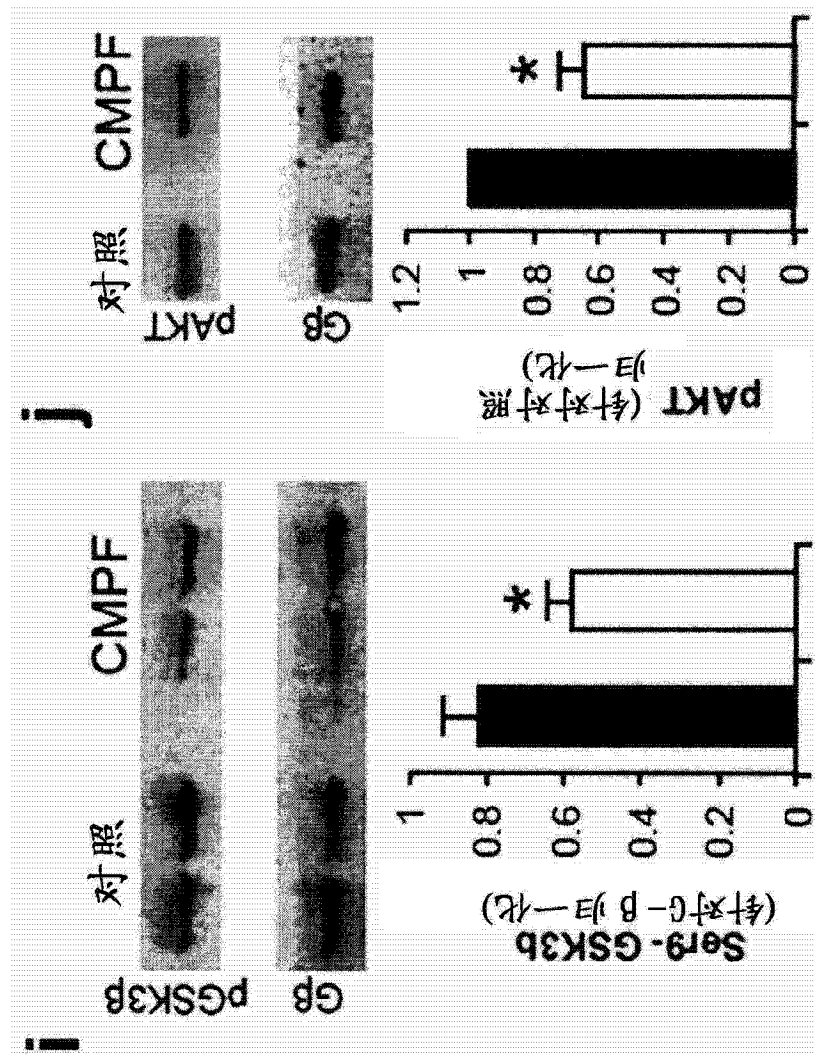


图 17(续)

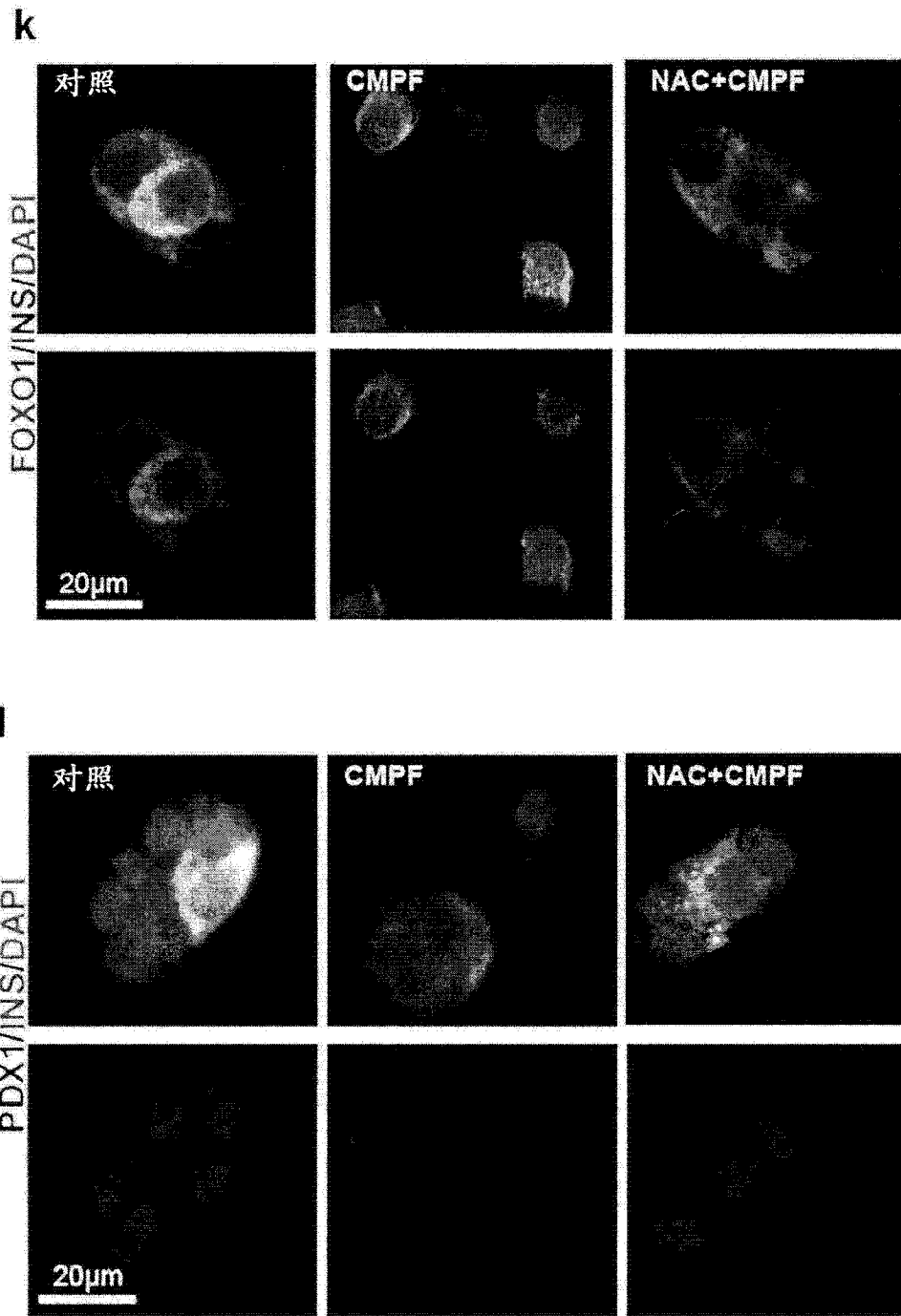


图 17(续)

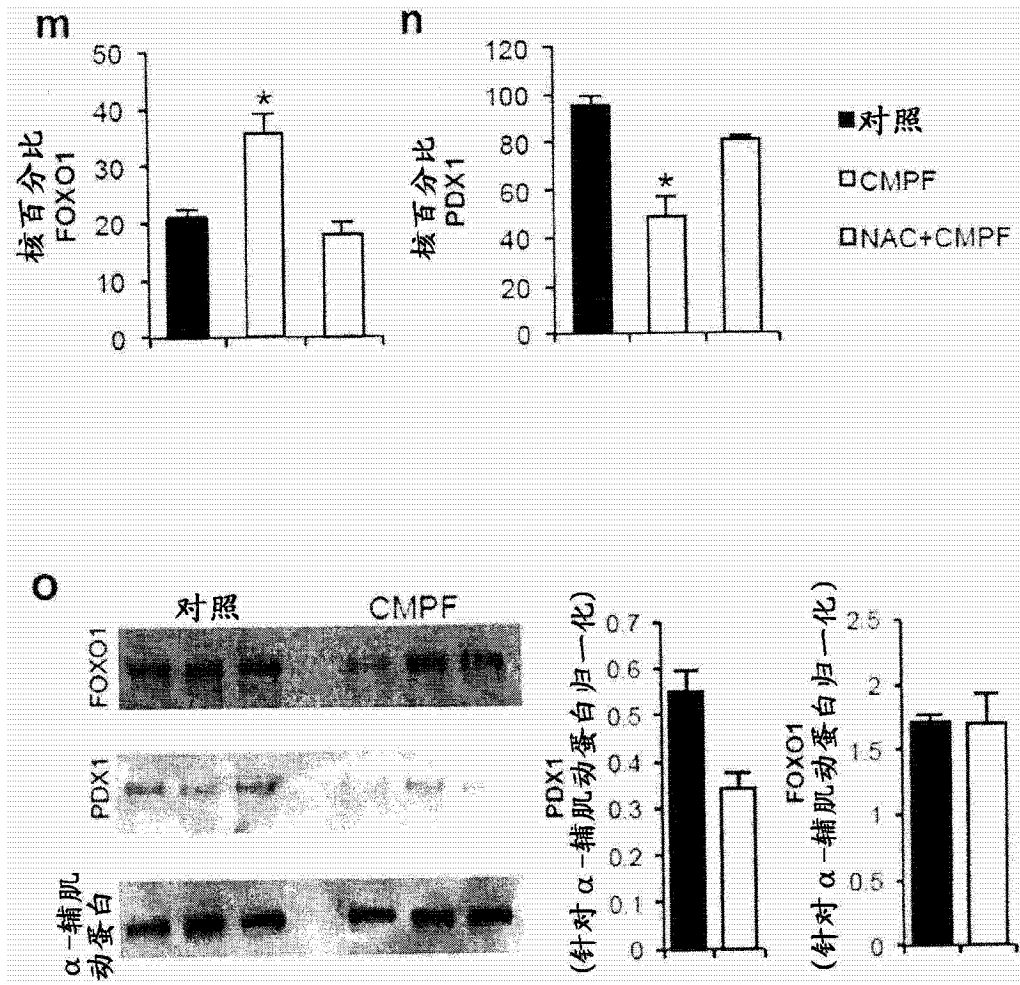


图 17(续)

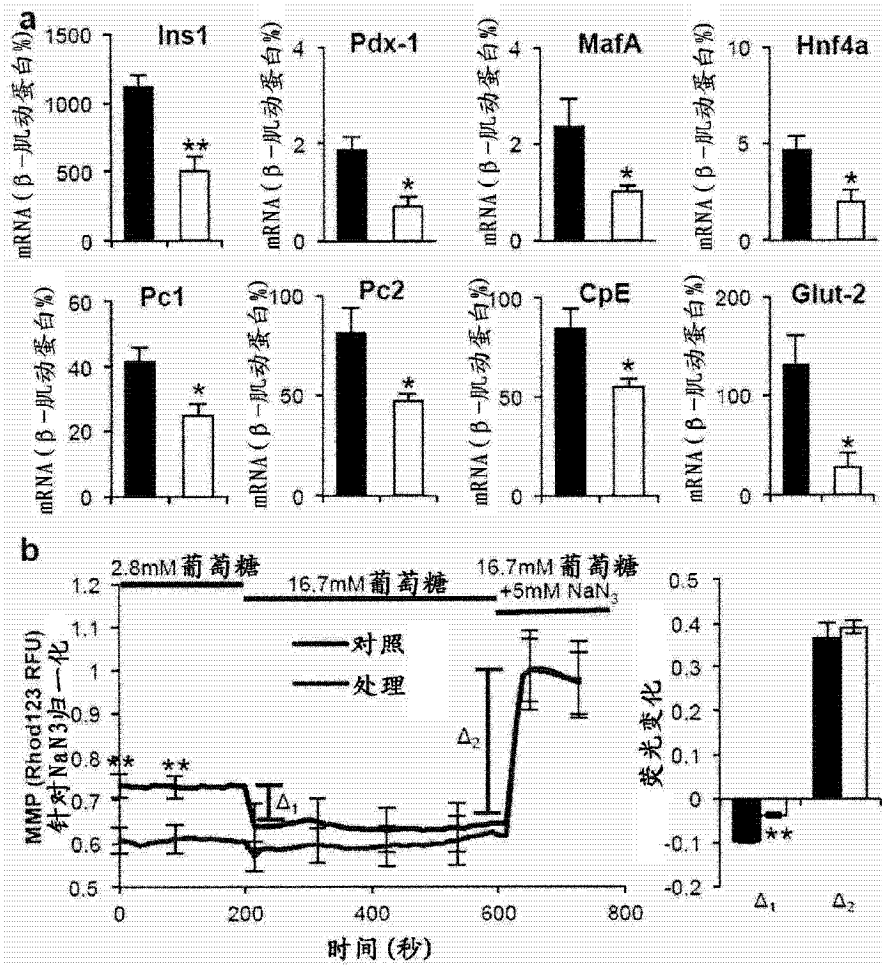


图 18

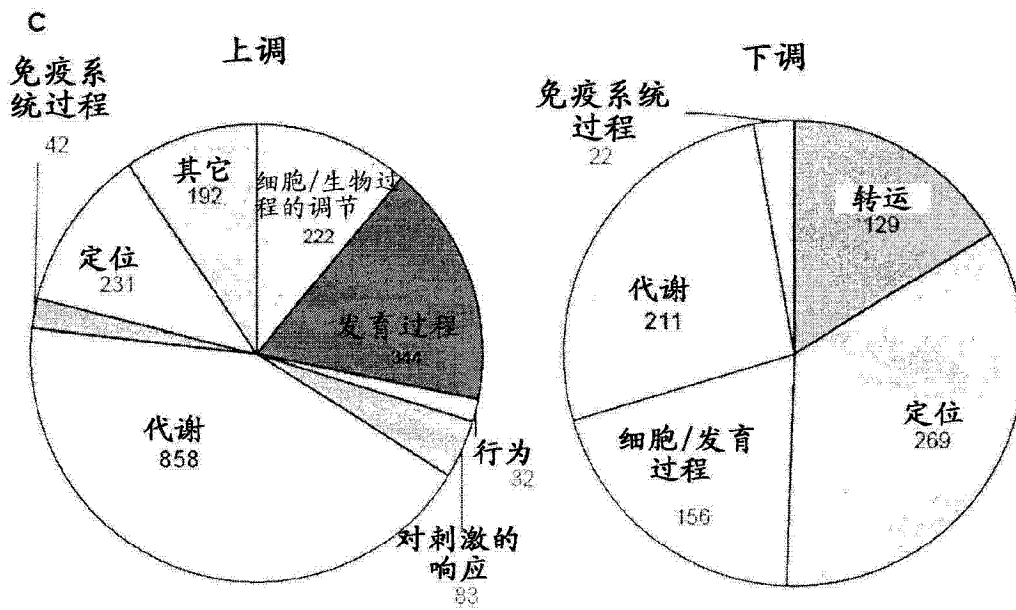


图 18(续)

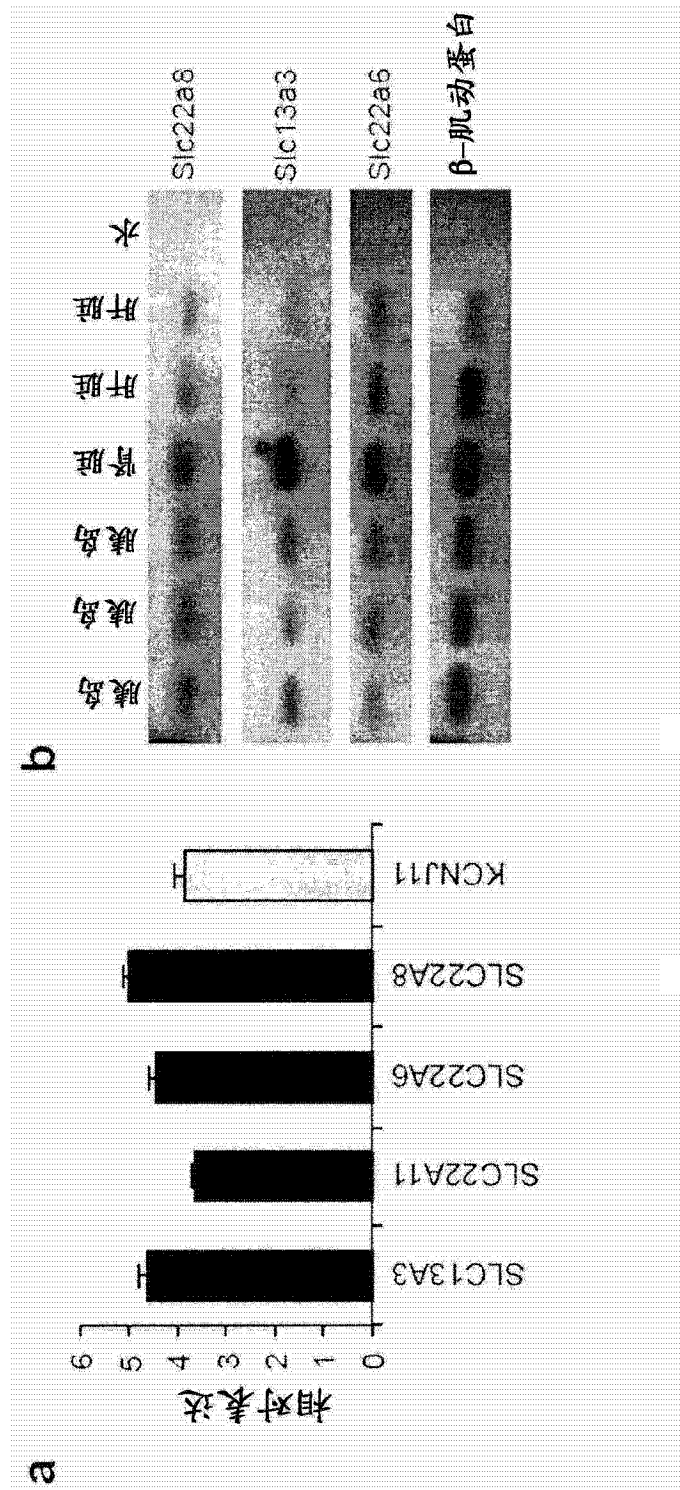


图 19

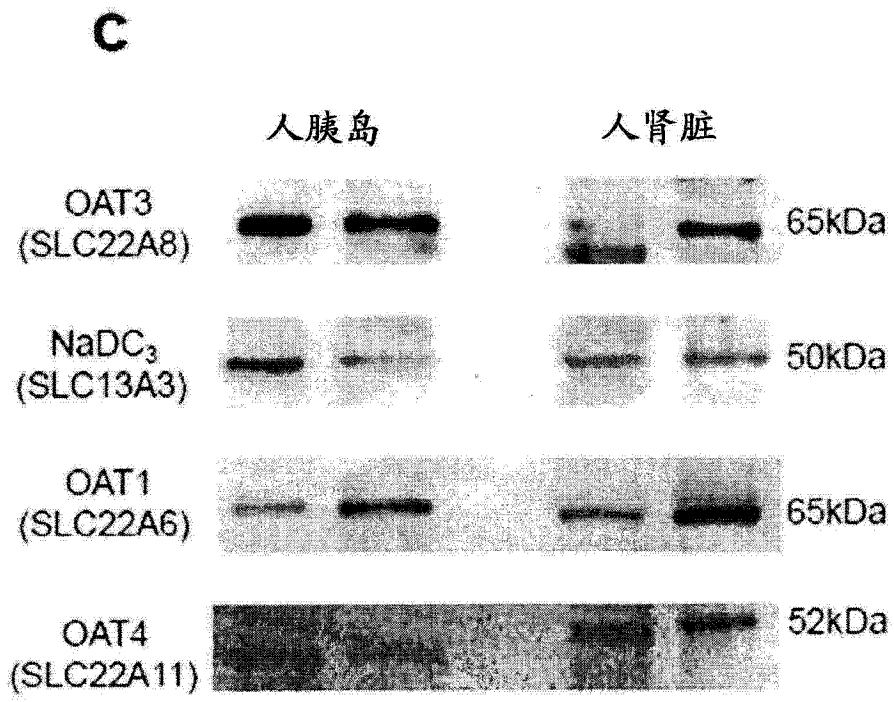


图 19(续)

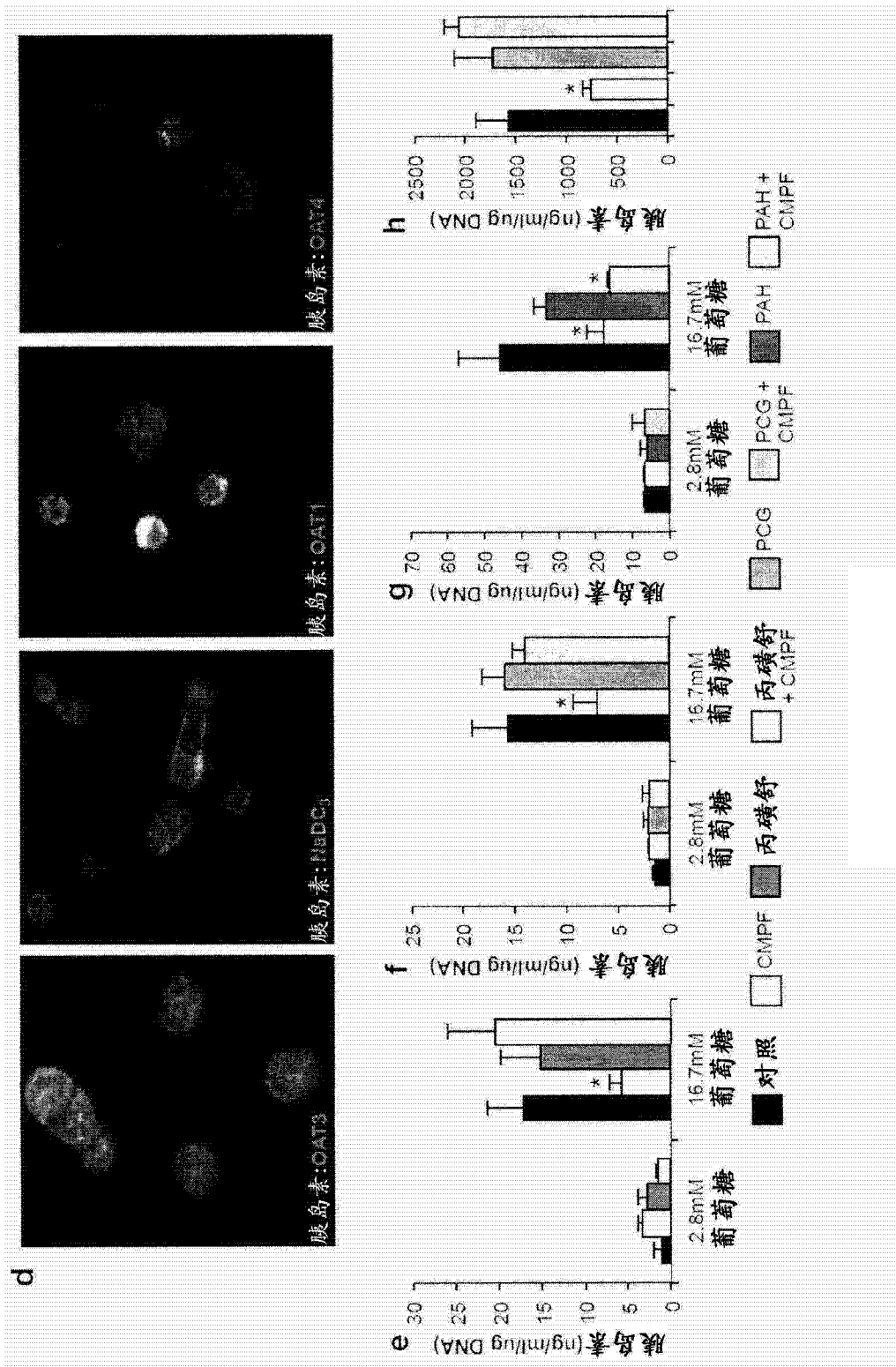


图 19(续)

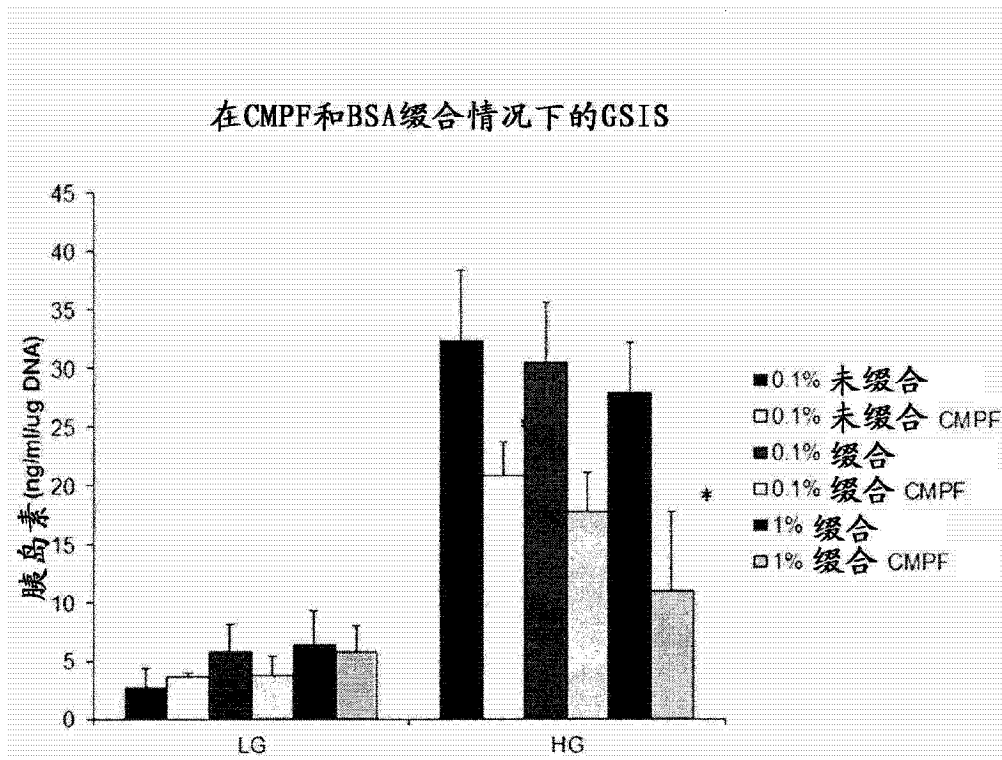


图 20

专利名称(译)	作为糖尿病的生物标志物的CMPF和相关方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104822378A</a>	公开(公告)日	2015-08-05
申请号	CN201380060932.9	申请日	2013-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	多伦多大学理事会		
申请(专利权)人(译)	多伦多大学理事会		
当前申请(专利权)人(译)	多伦多大学理事会		
[标]发明人	M惠勒 K普伦蒂塞 戴菲寒 R雷特纳卡兰		
发明人	M·惠勒 K·普伦蒂塞 戴菲寒 R·雷特纳卡兰		
IPC分类号	A61K31/43 G01N33/53 G01N33/543 A61K31/196 A61K31/198 A61P3/08 A61P3/10 C07D307/68 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N30/72 G01N33/48 G01N33/483		
CPC分类号	G01N2800/52 G01N2800/042 G01N33/5023 A61K31/195 G01N2030/8822 G01N33/507 G01N2800/50 A61K31/43 A61K31/198 C07D307/68 A61K31/196 A61K38/177 A61P3/08 A61P3/10 Y10T436/142222 G01N33/5005 G01N33/5308		
优先权	61/703867 2012-09-21 US 61/787718 2013-03-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于鉴定或监测患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者的方法。羧基-4-甲基-5-丙基-2-咪喃丙酸(CMPF)被证实是葡萄糖稳态受损和/或特征在于β-细胞功能障碍的病况的生物标志物。将受试者中的CMPF的测试水平与对照水平相比较鉴定出患有葡萄糖稳态受损或有患葡萄糖稳态受损风险的受试者。还提供了引起葡萄糖稳态受损或β-细胞功能障碍的方法和对影响β-细胞活性的化合物进行筛选的方法。还提供了通过降低受试者中CMPF的生理水平来治疗β-细胞功能障碍的方法以及OAT调节剂用于治疗β-细胞功能障碍的用途。

