

發明專利說明書

※申請案號：096109129

※IPC 分類：G01N 33/567 ; A61K 39/395 , 48/00 ; A1

一、發明名稱：

一種用於治療胰島素阻抗之醫藥組合物、用途及產品
Pharmaceutical Composition for Insulin Resistance
Treatment and Application and Kit Thereof

二、中文發明摘要：

本發明係提供一方法用以治療胰島素阻抗以及提供一方法確認一治療胰島素阻抗的化合物。

三、英文發明摘要：

Disclosed are a method for treating insulin resistance and a method identifying a compound for treating insulin resistance.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 本發明係關於治療胰島素阻抗之方法，並提供一種用以治療胰島素阻抗之化合物。

【先前技術】

[0002] 胰島素阻抗(insulin resistance)或葡萄糖耐受不良(glucose intolerance)之特徵在於身體無法妥善利用胰島素或血糖之情況。在此一症狀下，正常量的胰島素無法於脂肪細胞、肌肉細胞或肝臟細胞適當產生正常的胰島素反應。脂肪細胞的胰島素阻抗會導致儲存的三酸甘油酯水解，使得血漿中的自由脂肪酸含量升高。肌肉細胞的胰島素阻抗會減低葡萄糖攝取，而肝臟的胰島素阻抗會減低葡萄糖的儲藏，由於以上兩者作用導致血糖上升。高血漿胰島素以及高血糖乃是肇因於胰島素阻抗，通常會產生代謝症狀例如腹部肥胖、動脈粥樣化的血脂肪不正常(atherogenic dyslipidemia)、血

壓上升、血栓形成前狀態(prothrombotic state)(例如高血漿纖維蛋白原(fibrinogen)或胞漿素原(plasminogen)活化因子抑制子I)，發炎前期狀態(proinflammatory state)(例如血液中C-反應蛋白(C-Reactive Protein)上升)。具有代謝症狀的人產生心血管疾病以及第二型糖尿病的風險會上升。而具有代謝症狀的人在美國普遍性地增加。因此尋找有效治療胰島素阻抗成為一種需求。

【發明內容】

[0003] 本發明係關於治療胰島素阻抗，並確認一用以治療胰島素阻抗之化合物。

[0004] 本發明之一方面在於提供一種方法，用以鑑定治療胰島素阻抗之化合物。該方法包含將一待測化合物接觸一表現第三型酸敏感性離子通道蛋白(acid sensing ion channel 3(ASIC3))第一細胞；以及量測細胞中第三型酸敏感性離子通道蛋白之表現或是活性程度。如果表現或是活性程度低於一以相同方法處理但未與待測化合物接觸的第二細胞之表現或活性程度時，表示待測化合物為治療胰島素阻抗之候選化合物。第三型酸敏感性離子通道蛋白的活性可以電物理(electrophysical)分析。第三型酸敏感性離子通道蛋白的離子通道活性可以全細胞電流紀錄(whole cell patch recording)，電壓敏感染色(voltage-sensitive dye)，離子敏感染色(ion-sensitive dye)或細胞毒性試驗來決定。上述方法可進一步包含以候選化合物對非人類動物進行處理，以確認其治療胰島素阻抗的效果。前述第一細胞或第二細胞可為非神經原細胞或是AdiproR2細胞，例如NIH3T3細胞、NIH3T3 L1細胞、已分化NIH3T3 L1細胞、脂肪細胞(adipose cells)和纖維母細胞(fibroblast cells)。前述第一或第二細胞可對於FAS、FGF10(纖維母細胞生長因子10)、aP2(脂肪酸結合蛋白2)、ETO(氧化乙烯)、PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ ；過氧化物酶體增長因子活化受體)以及AdipoR1(adiponectin receptor 1；脂聯素受體1)其中之一項或多項有反應。在一實施例當中，前述第一細胞或第二細胞為脂肪組織細胞，例如白脂肪組織細胞(white adipose tissue cell)。

[0005] 另一方面，本發明提供一治療胰島素阻抗的方法，包含確認一具有胰島素阻抗或有發展為胰島素阻抗風險之對象；抑制該對象之第三型酸敏感性離子通道蛋白；量測該對象之第三型酸敏感性離子通道蛋白抑制前或抑制後之表現量以及活性程度；以及與控制組之表現程度或活性程度比較，以確認抑制。前述之抑制步驟係對前述對象施予一有效量之多胜肽結合至第三型酸敏感性離子通道蛋白，或是以一核酸減少第三型酸敏感性離子通道蛋白的表現量。控制組的表現程度係來自正常對象。

[0006] 本發明又提供一治療胰島素阻抗的方法，包含確認一具有胰島素阻抗或有發展為胰島素阻抗風險之對象；施予一有效量之第三型酸敏感性離子通道蛋白抑制劑至前述對象。前述抑制劑可為連結之第三型酸敏感性離子通道蛋白之多胜肽或是一核酸以減少第三型酸敏感性離子通道蛋白的表現量。舉例而言，抑制劑可為抗體、反義核酸(antisense-nucleic acid)或一RNAi(干擾RNA)試劑。控制組織

表現程度係來自正常對象。

- [0007] 本發明提供一緊急救治胰島素阻抗的方法，包含確認一具有胰島素阻抗或有發展為胰島素阻抗風險之對象；以及於進食一小時內，施予一有效量之第三型酸敏感性離子通道蛋白抑制劑至前述對象。
- [0008] 前述抑制劑可為連結至第三型酸敏感性離子通道蛋白之多胜肽或是一核酸以減少第三型酸敏感性離子通道蛋白的表現量。舉例而言，抑制劑可為抗體、反義核酸(antisense-nucleic acid)或一RNAi(干擾RNA)試劑。控制組織表現程度係來自正常對象。
- [0009] 另一方面，本發明提供一種用以治療胰島素阻抗之醫藥組合物，其係包含：有效量之第三型酸敏感性離子通道蛋白3(acid sensing ion channel 3, ASIC3)的抑制劑；及藥學上可接受之添加劑。
- [0010] 本發明又提供一種ASIC3抑制劑於製備治療胰島素阻抗之醫藥組合物之用途，其中前述醫藥組合物包含：有效量之ASIC3抑制劑；及藥學上可接受之載體。
- [0011] 較佳地，前述抑制劑係為連結至第三型酸敏感性離子通道蛋白3之多胜肽或一減少第三型酸敏感性離子通道蛋白3之表現量的核酸。
- [0012] 較佳地，前述多胜肽為抗體。
- [0013] 較佳地，前述多胜肽為APETx2。
- [0014] 較佳地，前述減少第三型酸敏感性離子通道蛋白3之表現量的核酸為反義核酸、干擾RNA。
- [0015] 較佳地，前述添加劑係為溶劑、分散劑、抗生素、抗黴菌劑、等滲透壓與延遲吸收劑或其組合。
- [0016] 較佳地，前述醫藥組合物，其為膠囊、凝膠密合或片劑。
- [0017] 本發明更提供一種用以治療胰島素阻抗之套裝產品，其係包含：前述醫藥組合物；一容器；即一前述醫藥組合物的使用說明。
- [0018] 本發明之一個或多個實施例之細節係陳述如下。本發明之其他特徵、標的以及優點將仔細陳述如下以及專利申請範圍。

【實施方式】

- [0019] 本發明係基於，至少是部分，一未預期之發現-ASIC3-/-小鼠由於胰島素敏感度被強化而可被保護對抗與年紀相關的葡萄糖耐受不良現象(glucose intolerance)，而與年紀相關的葡萄糖耐受不良現象係與白脂肪組織(white adipose tissue, WAT)而非感覺神經原的ASIC3正向調控(up-regulation)有關。
- [0020] 當胞外pH值驟降，第三型酸敏感性離子通道蛋白(acid sensing ion channel(ASICs))會調整向內的電流(inward current)並將細胞去極化(Krishtal, 2003, Trends Neurosci. 26, s477-483)。其屬於上皮鈉離子通道/退化蛋白(degenerin)超家族，特徵在於(membrane-spanning domain)包含細胞內N-與C-端以及一大的細胞外環(loop)之兩個跨膜區域(Waldmann and Lazdunski, 1998, Curr. Opin. Neurobiol. 8, 418-424 and Kellenberger and Schild, 2002, Physiol. Rev. 82, 735-767)。ASICs有七種次單位，分別包含ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、

ASIC2b、ASIC3、ASIC4以及ASIC5，由五個基因所轉譯(encode)。數個次單位組合成為一具功能的離子通道。同次單位或異次單位的ASICs對於細胞外的pH值有不同的敏感度，從接近身體之pH值(ASIC3為約pH7.0)到非常酸的狀態(ASIC2a為約pH5.0)皆有(Krishtal, 2003, Trends Neurosci. 26, 477-483)。因此，ASICs被認為在偵測組織酸中毒(acidosis)、局部缺血(ischemia)以及調控突觸活動扮演一定的角色(Molliver et al., 2005, Molecular Pain 1, 35, and Xiong et al., 2004, Cell 118, 687-698)。

- [0021] ASIC3是最敏感的第三型酸敏感性離子通道蛋白(pH 0.5活化~pH6.7)，主要表現於初級感覺神經原(primary sensory neurons)，特別是在代謝感知相關的感覺神經原(metaboreceptive sensory neurons)或是局部缺血感知神經原(Waldmann and Lasdunski, 1998, Curr. Opin. Neurobiol. 8, 418-424)。ASIC3在去極化局部缺血感知神經原時對乳酸的反應比對其他酸類反應佳。因此，表現ASIC3的神經原也許扮演代謝感知受器的角色，可感知組織厭氧代謝，並引起肌肉和心臟的傳遞酸引起的痛感(acid-linked pain sensation)(Molliver et al., 2005, Molecular Pain 1, 35)。
- [0022] 本發明之特徵在於提供一種方法，用來鑑定ASIC3的抑制劑以治療胰島素阻抗。一統計方法上顯著可降低 ASIC3的表現量或通道活性的ASIC3抑制劑，可根據以下方法被確認出來。
- [0023] 欲篩選之候選化合物(例如蛋白質、胜肽、模擬肽(peptidomimetics)、類肽(peptoids)、抗體、小分子或其他藥物)可利用習知技術之組合庫(combinatorial library)方法中的數種路徑取得。組合庫包括：胜肽庫、類肽庫(資料庫中的分子具有胜肽的功能，但擁有新穎非胜肽的骨架，可抵抗酵素分解)，空間可定位平行固相或液相資料庫(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries)；經由運算(deconvolution)或是親和層析法(affinity chromatography)所得之合成資料庫；以及“一珠一化合物”(one bead-one compound)資料庫。(參考Zuckermann *et al.* 1994, J. Med. Chem. 37 : 2678-2685 ; and Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12 : 145. Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in, e.g., DeWitt *et al.*, 1993, PNAS USA 90 : 6909 ; Erb *et al.*, 1994, PNAS USA 91 : 11422 ; Zuckermann *et al.*, 1994, J. Med. Chem. 37 : 2678 ; Cho *et al.*, 1993, Science 261 : 1303 ; Carrell *et al.*, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 : 2059 ; Carell *et al.*, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 : 2061 ; and Gallop *et al.*, 1994 J. Med. Chem. 37 : 1233. Libraries of compounds may be presented in solution(e.g., Houghten, 1992, Biotechniques 13 : 412-421), or on beads(Lam, 1991, Nature 354 : 82-84), chips(Fodor, 1993, Nature 364 : 555-556), bacteria(U. S. Patent No. 5, 223, 409), spores(U. S. Patent

No. 5, 223, 409), plasmids(Cull *et al.*, 1992, PNAS USA 89 : 1865-1869), or phages(Scott and Smith 1990, Science 249 : 386-390 ; Devlin, 1990, Science 249 : 404-406 ; Cwirla *et al.*, 1990, PNAS USA 87 : 6378-6382 ; Felici 1991, J. Mol. Biol. 222 : 301-310 ; and U. S. Patent No. 5, 223, 409))

- [0024] 為確認一ASIC3抑制劑，可將一待測化合物接觸一含有ASIC3基因或多胜肽之系統。該系統可為無細胞系統或是含細胞系統，例如一試管內細胞株或是試管外的動物模式。在一含細胞之系統當中，細胞可以自然表現ASIC3基因或是可被改造為表現一重組核苷酸。該重組核苷酸可含有ASIC3基因的編碼區(coding region)融合一異質(heterologous)啟動子或一ASIC3基因的啟動子融合一報導基因。之後測量ASIC3含多胜肽通道之表現程度或通道活性。
- [0025] 上述之一ASIC3多胜肽係指一ASIC3多胜肽之全長或是功能等價體(functional equivalent)。一功能等價體係指來自ASIC3多胜肽之多胜肽，例如一融合胜肽或一具有一個或多個點突變、插入(insertion)、刪除(deletion)、修剪(truncation)或任意組合前述方式之多胜肽。此多胜肽仍然實質具有ASIC3多胜肽之正常功能性通道的活性，例如當胞外pH值驟降會調整向內的電流並將細胞去極化。以下顯示ASIC3之多種轉錄變異以及多種SNP(Single Nucleotide Polymorphism；單核苷酸多態性)之胺基酸以及核苷酸序列。(SEQ ID NO : 1-6)
- [0026] SEQ ID NO : 1
- [0027] Transcript variant 1(isoform a) : 531 a. a.
- [0028] ACCESSION NP_004760
- [0029] 1 MKPTSGPEEA RRPASDIRVF ASNCMHGLG HVFGPGSLSL RRMWAAAVV
LSVATFLYQV
- [0030] 61 AERVRYREF HHQTALDERE SHRLIFPAVT LCNINPLRRS RLTPNDLHWA
GSALLGLDPA
- [0031] 121 EHAFLRALG RPPAPPGFMP SPTFDMAQLY ARAGHSLDDM LLDCRFRGQP
CGPENFTTIF
- [0032] 181 TRMGKCYTFN SGADGAELLT TTRGGMGNGL DIMLDVQEE YLPVWRDNEE
TPFEVGIRVQ
- [0033] 241 IHSQEEPPII DQLGLGVSPG YQTFVSCQQQ QLSFLPPPWG DCSSASLNPN
YEPEPSDPLG
- [0034] 301 SPSPSPSPY TLMGCRLACE TRYVARKCGC RMVYMPGDVP VCSPQQYKNC
AHPAIDAMLR
- [0035] 361 KDSCACPNPC ASTRYAKELS MVRIPSRAAA RFLARKLNRS EAYIAENVLA
LDIFFEALNY
- [0036] 421 ETVEQKKAYE MSELLGDIGG QMGLFIGASL LTILEILDYL CEVFRDKVLG
YFWNRQHSQR
- [0037] 481 HSSTNLLQEG LGSHTQVPH LSLGPRPPTP PCAVTKTLSA SHRTCYLVTQ
L

[0038] **SEQ ID NO : 2**
[0039] Transcript variant 1(isoform a) : 1746 bp
[0040] ACCESSION NM_004769
[0041] 1 agaattcggc acgacggggt tctggccatg aagcccacct caggcccaga
ggaggcccgg
[0042] 61 cgccagcct cggacatccg cgtgttcgcc agcaactgct cgatgcacgg
gctgggccac
[0043] 121 gtcttcgggc caggcagcct gagcctgcgc cgggggatgt gggcagcggc
cgtggtcctg
[0044] 181 tcagtggcca ccttctcta ccaggtggct gagagggtgc gctactacag
ggagtccac
[0045] 241 caccagactg ccctggatga gcgagaaagc caccggctca tcttcccggc
tgtcacctg
[0046] 301 tgcaacatca acccactgcg ccgctcgcgc ctaacgccca acgacctgca
ctgggctggg
[0047] 361 tctgcgctgc tgggcctgga tcccgcagag cacgccgctt tcttgcgcgc
cctgggccgg
[0048] 421 cccctgcac cgcccggctt catgccagt cccaccttg acatggcgca
actctatgcc
[0049] 481 cgtgctgggc actccctgga tgacatgctg ctggactgtc gcttccgtgg
ccaaccttgt
[0050] 541 gggcctgaga acttcaccac gatcttcacc cggatgggaa agtgctacac
atttaactct
[0051] 601 ggcgctgatg gggcagagct gctcaccact actaggggtg gcatgggcaa
tgggctggac
[0052] 661 atcatgctgg acgtgcagca ggaggaatat ctacctgtgt ggagggacaa
tgaggagacc
[0053] 721 ccgtttgagg tggggatccg agtgcagatc cacagccagg aggagccgcc
catcatcgat
[0054] 781 cagctgggct tgggggtgtc cccgggctac cagaccttg tttcttgcca
gcagcagcag
[0055] 841 ctgagcttcc tgccaccgcc ctggggcgat tgcagttcag catctctgaa
ccccaactat
[0056] 901 gagccagagc cctctgatcc cctaggctcc cccagcccca gccccagccc
tcctatacc
[0057] 961 cttatggggt gtcgcctggc ctgcgaaacc cgctacgtgg ctcggaagtg
cggctgccga
[0058] 1021 atggtgtaca tgccaggcga cgtgccagtg tgcagcccc
agcagtacaa gaactgtgcc
[0059] 1081 caccggcca tagatgcat gcttcgcaag gactcgtgcg
cctgccccaa cccgtgcgc

[0060] 1141 agcacgcgct acgccaagga gctctccatg gtgcggatcc
cgagccgcgc cgccgcgcgc

[0061] 1201 ttcttgccc ggaagctcaa ccgcagcgag gcctacatcg
cggagaacgt gctggccctg

[0062] 1261 gacatcttct ttgaggccct caactatgag accgtggagc
agaagaaggc ctatgagatg

[0063] 1321 tcagagctgc ttggtgacat tgggggcccag atggggctgt
tcatcggggc cagcctgctc

[0064] 1381 accatcctcg agatcctaga ctacctctgt gaggtgttcc
gagacaaggt cctgggatat

[0065] 1441 ttctggaacc gacagcactc ccaaaggcac tccagcacca
atctgcttca ggaagggctg

[0066] 1501 ggcagccatc gaaccaagt tccccacctc agcctgggcc
ccagacctcc caccctccc

[0067] 1561 tgtgccgtca ccaagactct ctccgcctcc caccgcacct
gctaccttgt cacacagctc

[0068] 1621 tagacctgct gtctgtgtcc tcggagcccc gccctgacat
cctggacatg cctagcctgc

[0069] 1681 acgtagcttt tccgtcttca ccccaaataa agtcctaag
catcaaaaaa aaaaaaaaaa

[0070] 1741 aaaaaa

[0071] **SEQ ID NO : 3**

[0072] Transcript variant 2(isoform b) : 549 a. a.

[0073] ACCESSION NP_064717

[0074] 1 MKPTSGPEEA RRPASDIRVF ASNCSMHGLG HVFGPGSLSL RRGMWAAAV
LSVATFLYQV

[0075] 61 AERVRYREF HHQTALDERE SHRLIFPAVT LCNINPLRRS RLTPNDLHWA
GSALLGLDPA

[0076] 121 EHA AFLRALG RPPAPPGFMP SPTFDMAQLY ARAGHSLDDM LLDCRFRGQP
CGPENFTTIF

[0077] 181 TRMGKCYTFN SGADGAELLT TTRGGMGNGL DIMLDVQQEE YLPVWRDNEE
TPFEVGIRVQ

[0078] 241 IHSQEEPPII DQLGLGVSPG YQTFVSCQQQ QLSFLPPPWG DCSSASLNPN
YEPEPSDPLG

[0079] 301 SPSPPSPY TLMGRLACE TRYVARKCGC RMVYMPGDVP VCSPQQYKNC
AHPAIDAMLR

[0080] 361 KDSCACPNPC ASTRYAKELS MVRIPSRAAA RFLARKLNRS EAYIAENVLA
LDIFFEALNY

[0081] 421 ETVEQKKAYE MSELLGDIGG QMGLFIGASL LTILEILDYL CEVFRDKVLG
YFWNRQHSQR

[0082] 481 HSSTNLLQEG LGSHRTQVPH LSLGPSTLLC SEDLPPLPVP SPRLSPPPTA
PATLSHSSRP

[0083] 541 AVCVLGAPP
[0084] **SEQ ID NO : 4**
[0085] Transcript variant 2(isoform b) : 1766bp
[0086] ACCESSION NM_020321
[0087] 1 agaattcggc acgacggggt tctggccatg aagcccacct caggcccaga
ggaggcccgg
[0088] 61 cggccagcct cggacatccg cgtgttcgcc agcaactgct cgatgcacgg
gctgggccac
[0089] 121 gtcttcgggc caggcagcct gagcctgcgc cgggggatgt gggcagcggc
cgtggtcctg
[0090] 181 tcagtggcca ccttcctcta ccaggtggct gagagggtgc gctactacag
ggagtccac
[0091] 241 caccagactg ccctggatga gcgagaaagc caccggctca tcttcccggc
tgcaccctg
[0092] 301 tgcaacatca acccactgcg ccgctcgcgc ctaacgcca acgacctgca
ctgggctggg
[0093] 361 tctgcgctgc tgggctgga tcccgcagag cacgccgctt tcctgcgcgc
cctgggccgg
[0094] 421 cccctgcac cgcccggctt catgcccagt cccacctttg acatggcgca
actctatgcc
[0095] 481 cgtgctgggc actccctgga tgacatgctg ctggactgtc gcttccgtgg
ccaaccttgt
[0096] 541 gggcctgaga acttcaccac gatcttcacc cggatgggaa agtgctacac
atttaactct
[0097] 601 ggcgctgatg gggcagagct gctcaccact actaggggtg gcatgggcaa
tgggctggac
[0098] 661 atcatgctgg acgtgcagca ggaggaatat ctacctgtgt ggagggacaa
tgaggagacc
[0099] 721 ccgtttgagg tggggatccg agtgcagatc cacagccagg aggagccgcc
catcatgat
[0100] 781 cagctgggct tgggggtgtc cccgggctac cagacctttg tttcttgcca
gcagcagcag
[0101] 841 ctgagcttcc tgccaccgcc ctggggcgat tgcagttcag catctctgaa
ccccaactat
[0102] 901 gagccagagc cctctgatcc cctaggetcc cccagcccca gccccagccc
tcctatacc
[0103] 961 cttatggggt gtcgcctggc ctgcgaaacc cgctacgtgg ctcggaagtg
cggctgccga
[0104] 1021 atggtgtaca tgccaggcga cgtgccagtg tgcagcccc
agcagtacaa gaactgtgcc
[0105] 1081 caccggcca tagatgcat gcttcgcaag gactcgtgcg
cctgccccaa cccgtgcgcc

[0106] 1141 agcacgcgct acgccaagga gctctccatg gtgcggatcc
cgagccgcgc cgccgcgcgc

[0107] 1201 ttcttgccc ggaagctcaa ccgcagcgag gcctacatcg
cggagaacgt gctggccctg

[0108] 1261 gacatcttct ttgaggccct caactatgag accgtggagc
agaagaaggc ctatgagatg

[0109] 1321 tcagagctgc ttggtgacat tgggggcccag atggggctgt
tcatcggggc cagcctgctc

[0110] 1381 accatcctcg agatcctaga ctacctctgt gaggtgttcc
gagacaaggt cctgggatat

[0111] 1441 ttctggaacc gacagcactc ccaaaggcac tccagcacca
atctgcttca ggaagggctg

[0112] 1501 ggcagccatc gaaccaagt tccccacctc agcctgggcc
ccagcactct gctctgttcc

[0113] 1561 gaagacctcc caccctccc tgtgccgtca ccaagactct
ctccgctcc caccgacct

[0114] 1621 gctaccttgt cacacagctc tagacctgct gtctgtgtcc
tcggagcccc gccctgacat

[0115] 1681 cctggacatg cctagcctgc acgtagcttt tccgtcttca
cccaaataa agtcctaag

[0116] 1741 catcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

[0117] **SEQ ID NO : 5**

[0118] Transcript variant 3(isoform c) : 543 a. a.

[0119] ACCESSION NP_064718

[0120] 1 MKPTSGPEEA RRPASDIRVF ASNCSMHGLG HVFGPGSLSL RRGMWAAAV
LSVATFLYQV

[0121] 61 AERVRYREF HHQTALDERE SHRLIFPAVT LCNINPLRRS RLTPNDLHWA
GSALLGLDPA

[0122] 121 EHA AFLRALG RPPAPPGFMP SPTFDMAQLY ARAGHSLDDM LLDCRFRGQP
CGPENFTTIF

[0123] 181 TRMGKCYTFN SGADGAELLT TTRGGMGNGL DIMLDVQQEE YLPVWRDNEE
TPFEVGIRVQ

[0124] 241 IHSQEEPPII DQLGLGVSPG YQTFVSCQQQ QLSFLPPPWG DCSSASLNPN
YEPEPSDPLG

[0125] 301 SPSPPSPY TLMGRLACE TRYVARKCGC RMVYMPGDVP VCSPQQYKNC
AHPAIDAMLR

[0126] 361 KDSCACPNPC ASTRYAKELS MVRIPSRAAA RFLARKLNRS EAYIAENVLA
LDIFFEALNY

[0127] 421 ETVEQKKAYE MSELLGDIGG QMGLFIGASL LTILEILDYL CEVFRDKVLG
YFWNRQHSQR

[0128] 481 HSSTNLTSHP SLCRHQDSLRLPPHLLPCHT ALDLSVSSE PRPDILDMP
LHVAFPSQP

[0129] 541 IKS
[0130] **SEQ ID NO : 6**
[0131] Transcript variant 3(isoform c) : 1671bp
[0132] ACCESSION NM_020322
[0133] 1 agaattcggc acgacggggt tctggccatg aagcccacct caggcccaga
ggaggcccgg
[0134] 61 cggccagcct cggacatccg cgtgttcgcc agcaactgct cgatgcacgg
gctgggccac
[0135] 121 gtcttcgggc caggcagcct gagcctgcgc cgggggatgt gggcagcggc
cgtggtcctg
[0136] 181 tcagtggcca ccttcctcta ccaggtggct gagagggtgc gctactacag
ggagtccac
[0137] 241 caccagactg ccctggatga gcgagaaagc caccggctca tcttcccggc
tgcaccctg
[0138] 301 tgcaacatca acccactgcg ccgctcgcgc ctaacgcca acgacctgca
ctgggctggg
[0139] 361 tctgcgctgc tgggctgga tcccgcagag cacgccgctt tcctgcgcgc
cctgggccgg
[0140] 421 cccctgcac cgcccggctt catgcccagt cccacctttg acatggcgca
actctatgcc
[0141] 481 cgtgctgggc actccctgga tgacatgctg ctggactgtc gcttccgtgg
ccaaccttgt
[0142] 541 gggcctgaga acttcaccac gatcttcacc cggatgggaa agtgctacac
atttaactct
[0143] 601 ggcgctgatg gggcagagct gctcaccact actaggggtg gcatgggcaa
tgggctggac
[0144] 661 atcatgctgg acgtgcagca ggaggaatat ctacctgtgt ggagggacaa
tgaggagacc
[0145] 721 ccgtttgagg tggggatccg agtgcagatc cacagccagg aggagccgcc
catcatgat
[0146] 781 cagctgggct tgggggtgtc cccgggctac cagacctttg tttcttgcca
gcagcagcag
[0147] 841 ctgagcttcc tgccaccgcc ctggggcgat tgcagttcag catctctgaa
cccaactat
[0148] 901 gagccagagc cctctgatcc cctaggetcc cccagcccca gccccagccc
tcctatacc
[0149] 961 cttatggggt gtcgcctggc ctgcgaaacc cgctacgtgg ctcggaagtg
cggctgccga
[0150] 1021 atggtgtaca tgccaggcga cgtgccagtg tgcagccccc
agcagtacaa gaactgtgcc
[0151] 1081 caccggcca tagatgcat gcttcgcaag gactcgtgcg
cctgccccaa cccgtgcgcc

[0152] 1141 agcacgcgct acgccaagga gctctccatg gtgcggatcc
cgagccgcgc cgccgcgcgc

[0153] 1201 ttcttgccc ggaagctcaa ccgcagcgag gcctacatcg
cggagaacgt gctggccctg

[0154] 1261 gacatcttct ttgaggccct caactatgag accgtggagc
agaagaaggc ctatgagatg

[0155] 1321 tcagagctgc ttggtgacat tgggggcccag atggggctgt
tcatcggggc cagcctgctc

[0156] 1381 accatcctcg agatcctaga ctacctctgt gaggtgttcc
gagacaaggc cctgggatat

[0157] 1441 ttctggaacc gacagcactc ccaaaggcac tccagcacca
atctgacctc ccaccctcc

[0158] 1501 ctgtgccgtc accaagactc tctccgctc ccaccgcacc
tgctaccttg tcacacagct

[0159] 1561 ctagacctgc tgtctgtgtc ctcggagccc cgcctgaca
tcctggacat gcttagcctg

[0160] 1621 cacgtagctt ttccgtcttc accccaaata aagtccta
atgcatcaaaaa a

[0161] SEQ ID NO : 7

[0162] ASIC3之SNP變異

[0163] Cluster Report : rs3192795

[0164] CTCCCTGTGCCGTCACCAAGACTCT[C/T]TCCGCCTCCCACCGCACCTGCTACC

[0165]

重疊群作圖(Contig)-->mRNA-->蛋白質(Protein)	mRNA 方向	位置	功能	dbSNP 對偶 基因	蛋白質 殘 基	譯碼位 置 (Codon pos)	胺基 酸位 置
<u>NT_007914->NM_020321->NP_064717</u>	正向 (forward)	1595	非同義 (nonsynonymous)	T	Phe [F]	2	525
			參考序列(contig reference)	C	Ser [S]	2	525
<u>NT_007914->NM_020322->NP_064718</u>	正向	1516	非同義	T	Phe [F]	1	499
			參考序列	C	Leu [L]	1	499

[0166] SEQ ID NO : 8

[0167] Cluster Report : rs1864545

[0168] GAATATCTACCTGTGTGGAGGGACA[A/G]TGGTAGGGAGCACACAAATGAGGCT

[0169]

重疊群作圖 Contig->mRNA->蛋白質 (Protein)	mRNA 方向	位置	功能	dbSNP 對偶 基因	蛋白質殘 基	譯碼 位置 Codon pos	胺基 酸位 置
NT_007914->NM_004769->NP_004760	正向 forward	704	非同義	G	Ser [S]	2	228
			參考序列	A	Asn [N]	2	228
NT_007914->NM_020321->NP_064717	正向 forward	704	非同義	G	Ser [S]	2	228
			參考序列	A	Asn [N]	2	228
NT_007914->NM_020322->NP_064718	正向 forward	704	非同義	G	Ser [S]	2	228
			參考序列	A	Asn [N]	2	228

[0170] 表現程度可由mRNA表現量或蛋白質表現量決定。測量細胞中、組織樣本或體液中的mRNA量的方法為熟知此技藝之人所能輕易得知。為測量mRNA表現量，可將細胞分解以後，測量分解液(lysate)中的mRNA或是由分解液純化RNA或半純化RNA得知，例如雜合試驗(利用可偵測之基因特異性標示的DNA或RNA探針)以及定量或半定量RT-PCR(利用適當的基因特異性引子)。選擇性地，亦可使用組織切片或未分解之細胞懸浮液，及以可偵測(螢光或酵素)之標記DNA或RNA探針來進行定量或半定量原位雜交法。其他mRNA定量方法包括RNA保護試驗(RPA)以及SAGE(基因表達系列分析；serial analysis of gene expression)。

[0171] 測量細胞中、組織樣本或體液中的蛋白質量的方法為熟知此技藝之人所能輕易得知。許多這一類方法使用可專一性連結一目標蛋白的抗體(單株抗體或多株抗體)。這一類的試驗，抗體本身或是一連結該抗體之第二抗體被可偵測地標示。選擇性地，抗體可結合生物素(biotin)以及標示可偵測之卵白素(avidin)(一種多胜肽可結合生物素)，可用來偵測目前被生物素標示之抗體使否存在。結合這些方法(包含多層三明治法)可用以加強上述偵測方法的敏感度。有些蛋白質偵測方法(例如ELISA或是西方墨點法)，可用於體液或是細胞分解液，而其他方法(例如免疫組織染色法或螢光流式細胞技術(fluorescence flow cytometry))則使用於組織切片或是尚未分解之細胞懸浮液。偵測標示的方法係根據標示物的特性而定且為熟知此技藝之人所能輕易得知。適當的標示包括放射標示(例如¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³H或³²P)、酵素(例如：鹼性磷酸酶、辣根過氧化酶(HRP)、冷光酶(luciferase)、β-半乳糖甘酶)、螢光基團(moieties)或蛋白質(螢光素(flourescein)、若丹明(Rhodamine)、藻紅蛋白(phycoerythrin)、綠螢光蛋白(GFP)或藍螢光蛋白(BFP))、冷光基團(moieties)或蛋白質(Qdot™奈米分子由Quantun Dot有限公司PaloAlto, CA提供)。其他可使用之試驗包括定量免疫沈澱法或是競爭性酵素連結免疫吸附試驗。

- [0172] 測量ASIC3的離子通道活性為熟知此技藝之人所能輕易得知。實施例所使用的方法包括全細胞電位法(Whole-cell patch recording)(Waldmann *et al.*, J Biol Chem 272, 20975-20978(1997); Voilley *et al.*, J Neurosci 21, 8026-8033(2001); Molliver *et al.*, Molecular Pain 1: 35(2005); 電壓敏感染料(voltage-sensitive dye)(Felix *et al.*, Assay Drug Dev Technol. 2, 260-268(2004); Sharma *et al.*, Biophys J 88, 3038-3049(2005)); 離子敏感染料(ion-sensitive dye)以及細胞毒性試驗(cytotoxicity assay)(Weiser, J Neurosci Methods 137, 79-85(2004))。
- [0173] 為決定候選化合物抑制ASIC3的能力，係比較經由上述方法所得之表現量或活性與不具有候選化合物的控制組表現量或活性比較。
- [0174] 若表現量或活性低於控制組，則該化合物被確認為治療胰島素阻抗有效。吾人可進一步利用一動物模式證實一化合物之功效。吾人可將該化合物使用於動物模式，並利用下述實施例之方法或其他標準技術檢驗之。任何統計上顯著改善胰島素敏感度時即暗示該化合物為治療胰島素阻抗之候選藥物。
- [0175] 本發明亦揭露一種治療胰島素阻抗的方法。一欲治療之對象可依照標準診斷技術確認胰島素阻抗，例如糖尿病。選擇性地，該對象可根據上述方法檢查脂肪組織細胞(例如白脂肪組織)的ASIC3多胜肽的基因表現或 是活性進行檢查。若對象之檢體中基因表現或是通道活性高於正常人之檢體，則該對象為以一有效量之ASIC3抑制劑治療的候選人。
- [0176] 所謂”治療”係指對一具有胰島素阻抗之對象以一化合物處理，目的在於治癒、減緩、減輕、治療、預防、改善疾病、疾病症狀、疾病之第二期疾病狀態或疾病之好發性傾向。一”有效量”係指一化合物的量可以產生醫學上所欲之效果，例如上述被治療之對象。該治療方法可以活體內或活體外，單獨或結合其他藥物或療法實施。
- [0177] 於活體(in vivo)內方式，以一ASIC3抑制劑處理一對象。一般而言，使該化合物懸浮於製藥學可接受之載體(例如生理食鹽水)，以口服或是靜脈點滴(intravenous fusion)方式或注射或皮下植入、肌肉植入、腹腔植入、直腸內植入、陰道植入、鼻內植入、腸道內植入、氣管內植入、椎管內植入、肺內植入。為治療胰島素阻抗，該化合物可直接運送到白脂肪組織或周圍組織。
- [0178] 需求劑量係根據實施的路徑；劑型特性；病患生病狀況；對象的大小、重量、表面積、年齡、性別；施加其他的藥物；及參與醫師的判斷。適當的劑量在0.01-100mg/kg範圍內。所需之劑量的變異係基於各種可使用之化合物以及施用途徑的不同效率而定。例如口服被認為比起i.v.注射需要較高劑量。使用劑量的不同可根據該項技術領域眾所周知方式利用經驗法則來最佳化以進行校正。將化合物以一適當之運送載體(例如：聚合微顆粒或是可植入裝置)封裝(encapsulation)可以提升運送效率，特別是口服運送。
- [0179] 實施例中被用來治療胰島素阻抗之化合物包括多胜肽例如 APETx2(GTACSCGNSKGIYWFYRPSCTDRGYTGSCRYFLGTCCTPAD)及其功能等價物(functional equivalents)。一APETx2之功能性等價物係指

一衍生自APETx2的之多胜肽，例如一融合多胜肽或一具有一個或多個點突變、插入(insertion)、刪除(deletion)、修剪(truncation)或任意組合前述方式之多胜肽。此多胜肽仍然實質具有APETx2多胜肽之正常功能性通道的活性，例如抑制ASIC3同質通道或含有ASIC3之異質通道之能力，如Diochot et al. EMBO J. 2004, 23(7)：1516-25所述。

- [0180] 該多胜肽係使用已知方法合成或是利用重組技術準備。例如，吾人可轉殖一轉譯出該多胜肽的核酸於一表現載體，其中該核酸可以連結一適於在一宿主細胞表現一多胜肽調控序列操作之。吾人接著可將該載體送入一適當的宿主細胞以表現該多胜肽。該表現之重組多胜肽可利用方法自宿主細胞純化，例如硫酸氨沈澱以及分餾管柱層析法。參見Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. 一多胜肽可用以準備測試其抗ASIC3同質通道或含有ASIC3之異質通道之活性，方法參見以下之實施例或Diochot et al. EMBO J. 2004, 23(7)：1516-25. 。
- [0181] 可用以治療胰島素阻抗的實施例之組合物亦包含可連結多胜肽ASIC3之抗體。一“抗體”包含完整片段之分子，例如Fab、F(ab')₂、Fv、scFv(單鍊抗體)以及dAb(domain antibody；功能蛋白質片段抗體；Ward, et al. (1989) Nature, 341, 544)。一抗體衍生物係指一蛋白質或蛋白質複合體，其具有一本發明之多胜肽變異。本發明之一抗體或衍生物可藉由於一適當宿主細胞中共同表現相對應之輕鏈與重鏈含CDRs多胜肽，該方法為習知技術，參見Harlow and Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 。
- [0182] 為製造此處所指之一抗體，ASIC3多胜肽或其抗原片段可與一載體蛋白偶合，例如KLH，與一佐劑(adjuvant)混合，並注射於一宿主動物。該動物所產生之抗體可利用胜肽親和層析法純化。一般常使用之宿主動物包含兔子、老鼠、迷你豬(guinea pigs)與大鼠(rats)。各種佐劑可根據宿主種類被用以增加免疫反應，包括福氏佐劑(Freund's adjuvant)(完全與不完全)、礦物油(例如氫氧化鋁)、表面活性物質(例如脫脂酸卵磷脂(lysolecithin))、複合多元醇(pluronic polyols)、陰離子物質(polyanions)、多胜肽、油滴乳化劑(oil emulsion)、血氫蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)以及二硝基酚(dinitrophenol)。有用的人類佐劑包含卡介苗(bacille Calmette-Guerin)以及短棒狀桿菌(Corynebacterium parvum)。
- [0183] 多株抗體、抗體分子之異質族群係出現於被接種(immunize)之對象的血清當中。單株抗體，針對一特殊抗原的抗體分子之同質族群可使用標準融合瘤(hybridoma)技術製備。參考Kohler et al. (1975) Nature 256, 495；Kohler et al. (1976) Eur. J. Immunol. 6, 511；Kohler et al. (1976) Eur. J. Immunol. 6, 292；以及Hammerling et al. (1981) Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y. 特別是，單株抗體係可藉由任何有關

以持續培養之細胞株產生抗體分子技術獲得，如U. S. Patent No. 4, 376, 110；the human B-cell hybridoma technique(Kosbor et al. (1983)Immunol Today 4, 72；Cole et al. (1983)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026)以及the EBV hybridoma technique(Cole et al. (1983)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)所述。此抗體可為任一種類之免疫球蛋白種類包含IgG、IgM、IgE、IgA、IgD使及任何一種次分類。本發明產生單株抗體之融合瘤可於試管內或試管外培養。於試管外(in vivo)生產高力價(high titer)抗體為一特別有用之生產方法。

- [0184] 一含有轉譯-ASIC3抑制物之核酸序列的多核苷酸 (polynucleotide)可用以治療胰島素阻抗。該核酸序列可轉譯出上述多肽、一抗ASIC3抗體、一反譯RNA或一小干擾RNA(例如一RNAi)，其係以ASIC3為標的，抑制其表現或通道活性。
- [0185] 所謂的「RNAi」或「RNA干擾」係指藉由序列特異或選擇過程將一目標分子(例如目標基因、蛋白或RNA)降低調控(down-regulated)。本發明之範圍內係使用RNAi以降解RNA分子(例如在細胞中)。降解係由酵素性RNA誘導之沈默複合體(RNA-induced silencing complex；RSIC)催化。RNAi自然存在於細胞中用以移除外來RNA(例如病毒RNA)。自然RNAi經由片段切割游離之雙股RNA作用導致降解機制。選擇性地，RNAi可藉由例如人工方式將目標基因的表現抑制。
- [0186] 所謂的「RNAi試劑」係指一RNA(或其類似物)對於目標RNA(例如欲降解之RNA)有足夠序列與之互補以導向RNAi。所謂「一RNA試劑具有一足夠序列與目標RNA互補以導向RNAi」係指RNA試劑具有一序列足以引發RNAi機制(例如RISC複合體)或過程將目標RNA摧毀。所謂「一RNA試劑具有一足夠序列與目標RNA互補以導向RNAi」亦指RNA試劑具有一序列足以引發對目標RNA經由RNAi機制或過程所產生之轉譯抑制。一RNA試劑具有一足夠序列與由目標DNA所轉錄之目標RNA互補，使得目標DNA序列在染色體上沈默(抑制表現)。亦即，RNA試劑具有一序列足以引發轉譯基因沈默(gene silencing)，例如降低控制目標DNA序列上或附近的基因表現，如引發目標DNA序列上或附近的染色體結構改變。所謂「RNA」或「RNA分子」或「核糖核酸(ribonucleic acid)分子」係指核糖核苷酸(ribonucleotide)聚分子。所謂「DNA」或「DNA分子」或「去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)分子」係指去氧核糖核苷酸(deoxyribonucleotide)聚分子。DNA與RNA可自然合成(例如分別藉由DNA複製或DNA轉錄)。RNA可進行後轉錄修飾。DNA及RNA係可以化學方式合成。DNA及RNA可為單股(例如ssRNA以及ssDNA)或是多股(例如雙股dsDNA以及dsRNA)。
- [0187] 多聚核苷酸(polynucleotides)可利用習知聚合生物可分解之微粒或微膠囊運送系統。另一種達成核酸吸收的方式為使用微脂體，係根據標準方法製備。多聚核苷酸可單獨包入這些運送系統或是與組織特異抗體一起包入。選擇性地，吾人可製備一分子結合子(molecular conjugate)，其由一質體或其他載體利用靜電力或共

價力連結多聚賴氨酸(poly-L-lysine)。多聚賴氨酸連結一可與目標細胞受器(receptor)結合之配體(ligand)。(Cristiano, et al., 1995, J. Mol. Med. 73: 479)。選擇性地，組織特異標定可利用習知組織特異性轉錄調控因子達成。運送「裸露DNA」(例如不具有運送工具者)至肌肉內、皮膚內(intradermal)或皮下(subcutaneous)位置為另一種達到試管外表現的方法。

- [0188] 於上述之多聚核苷酸，例如表現載體，轉譯ASIC3抑制子的核酸序列可連接一啟動子或促進子(enhancer)結合啟動子。適合的表現載體包括質體以及病毒載體，例如皰疹病毒(herpes virus)、反轉錄病毒、牛痘病毒(vaccinia virus)、減毒牛痘病毒、金絲雀痘病毒(canary poxvirus)、腺病毒以及腺病毒相關病毒(adeno-associated virus; AAV)。
- [0189] 如該領域之習知技術，一病患所需之劑量需視上述之許多因子而定。劑量不同，但一多聚核苷酸施用之較佳劑量為 10^6 至 10^{12} 份數(copies)的多聚核苷酸分子。此一劑量若有需要可重複施用。施用的路徑可為上述之任一路徑。
- [0190] 一套裝產品亦為本發明之範圍，包含一容器、一有效量之ASIC3抑制劑以及一於容器上之說明，並指示抑制劑之施用以治療一遭受胰島素阻抗或具有潛在風險之對象。該抑制劑可混合藥學上可接受之載體，包含一溶劑、分散劑、外膜(coating)、抗生素以及抗黴菌劑，和一等滲透壓與延遲吸收劑。
- [0191] 抑制劑可依不同施用路徑使用傳統方法配置成製劑，例如，可配製成一膠囊、一凝膠密合(gel seal)或一片劑(tablet)用以口服。膠囊可包含任何藥學上可接受物質例如明膠或纖維素。片劑可根據傳統方法壓縮抑制劑與一固態載體和一潤滑劑之混合物。固態載體之實施例包含澱粉以及糖漿膨潤土(bentonite)。抑制劑亦可以一硬殼片劑或一含有結合劑(binder)，例如乳糖或甘露糖醇(mannitol)、一傳統填充劑以及一壓片劑(tableting agent)之膠囊施用。抑制劑可經由腸外(parenteral)路徑施用。實施例中所使用的腸外劑型包含水溶液、等滲透壓食鹽水或5%葡萄糖的活化劑或其他已知的藥學上可接受之賦型劑(excipient)。環糊精(cyclodextrins)或其他助溶劑(solubilizing agent)為熟知此技術之人所普遍瞭解，可作為藥學上的賦型劑用以運送治療物。進一步，抑制劑可藉由腦部手術直接注射於紋狀體(striatum)。
- [0192] 抑制劑的效率可藉由試管內或試管外方式評估。例如，抑制劑可測試其於試管內抑制ASIC3基因表現或通道活性的能力。在試管外研究，抑制劑可注射於一動物(例如一動物模式)，並評估其對於胰島素阻抗的效果。根據上述結果，可決定一適當劑量範圍與施用途徑。
- [0193] 上述ASIC3抑制劑例如APETx2對於胰島素阻抗的急性治療特別有用，例如在進食一小時以內施用。舉例說明，一對象可接受14mg/kg水楊酸(salicylic acid)或APETx2 0.23mg/kg。
- [0194] 上述ASIC3抑制劑例如APETx2可用以治療其他與ASIC3基因表現量或通道活性不正常地過高有關的疾病(例如肥胖)。一被治療之對象可

利用習知技術確認或利用測量來自前述對象所準備的檢體之ASIC3多胜肽基因表現或通道活性而得知。若ASIC3多胜肽基因表現或通道活性比一般正常人的檢體表現要來得高，則該對象為有效量ASIC3抑制劑的治療候選者。

- [0195] 以下係提供利用本發明之實施例詳細說明書、本發明之技術及特點，然本實施例並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾。
- [0196] ASIC3小鼠之產生方式如Chen等人於Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 8992-8997, 2002所述。Congenic129小鼠係由將ASIC3小鼠和雌性129S2/SvPasCrl野生型小鼠雜交而得。所有小鼠皆飼養於一12:12小時日光-黑暗循環(Cycle)、25°C環境以及40%-70%濕度之環境。所有實驗使用之雌性小鼠分為不同年齡組。這些動物於一特殊無感染源設施中飼養並根據*Guide for the Use of Laboratory Animals*(National Academy Press, Washington DC)照顧。試驗步驟係由中研院動物使用會議所核准。
- [0197] periovarian白脂肪組織(periovarian WAT)之脂肪墊(tat pads)係由母鼠分離。一克受分離之脂肪墊係以2mg/ml第八型膠原蛋白酵素(Sigma)於4ml DMEM當中於37°C分解1小時。接著，被分解之組織於4°C以200xg離心5分鐘。含有成熟脂肪細胞之上清液係蒐集用以作RNA分離。沉澱細胞(cell pellet)、基質血管層(SVF)，包含間葉細胞(mesenchymal cells)(脂肪母細胞(adipoblasts))以及未成熟之脂肪細胞(脂肪細胞前驅物以及postadipocytes)(Van, The adipocyte precursor cell. In: *New perspectives in adipose tissue: structure, function, and development*. Butterworths, Borough Green, England, chapt. 15, 353-382, 1985)。此SVF係蒐集以作RNA分離或重新懸浮於含有10%胎牛血清和抗生素之DMEM當中進行細胞培養。SVF細胞塗抹於每一蓋玻片(直徑12mm)，每一蓋玻片含有 10^5 濃度細胞，並維持於37°C以及5%潮濕二氧化碳狀態。培養之細胞接著進行全細胞電位記錄(Whole-cell patch recording)5天。
- [0198] 為了螢光染色，培養細胞以冰凍甲醇(icy methanol)固定5分鐘，接著於0.25% Triton X-100中滲透化5分鐘，並以PBS洗滌。將被固定的細胞置於一含有2% BSA和0.2% Triton X-100於PBS中的阻滯溶液(blocking solution)中1小時，並浸泡於一級抗體溶液(含有迷你豬抗ASIC3 1:250抗體，購自Neuromics；兔子抗ACRP30 1:200抗體，購自Chemicon)4°C隔夜。接著將細胞以PBS洗滌三次、每次三分鐘，並浸泡於以一阻滯緩衝液稀釋1:200之二級抗體1小時。二級抗體為山羊抗迷你豬連結Alexa Fluor 488以及抗兔子連結Alex Fluor 594抗體(Molecular Probes)。
- [0199] 總RNA係由冷凍組織樣本或利用Rneasy kit(Quiagen)所分離之脂肪細胞。總互補DNA(cDNA)係由總RNA利用Superscript III RT(Invitrogen)所合成。每一cDNA之即時聚合酶鏈反應係加入SYBR綠色染料，以便利用ABI Prism 700序列偵測系統(PE Applied Biosystem)測量雙股DNA的合成並均化GAPDH RNA的表現。所有SYBR綠色核心反應劑以及AmpliTaq Gold聚合酶係購自PE Applied

Biosystem(Foster City, CA)。該熱循環狀態為95°C 10分鐘，接著進行95°C 15秒以及60°C 1分鐘的40個循環。即時聚合酶鏈反所使用之引子如下： ASIC3 sense, 5' -TTTCACCTGTCTTGGCTCCT-3'

[0200] ASIC3 anti-sense, 5' -CAGGATAGTGGTGGGGATTG-3'

[0201] GAPDH sense, 5' -GGAGCCAAACGGGTCATCATCTC-3' , GAPDH anti-sense, 5' -GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3' .

[0202] 全細胞紀錄係使用初代脂肪細胞並利用Multiclamp 700B放大器(amplifier, Axon instrument)進行。將片電極(patch electrode)拉成1.5mm o. d. 的細絲玻璃(Water Instrument, Hamden, Conn., USA)，並以一含有100 mM KCl、10mM EGTA、5mM MgCl₂、40mM HEPES、2mM Na₂ATP以及0.3mM Na₃-GTP(pH值以KOH調整至7.4，滲透壓調整為300-310mOsm)。當裝滿溶液時電極具有一2-5MΩ電阻。標準外部溶液含有130mM NaCl、5mM KCl、1mM MgCl₂、2mM CaCl₂、10mM葡萄糖以及20mM HEPES(pH值以NaOH調整至7.4)。當得到一全細胞紀錄時，記錄係以一電壓-箝模式(Voltage-clamp mode)產生，而ASIC3媒介之電流會因經由一重力控制引流系統施加酸(以MES調整至pH=5.0)而引發。訊號以轉折頻率(Corner frequency)3kHz之低通濾波器處理，接著使用一CED1401介面(Cambridge Electronic Design, The Science Park, Cambridge, UK)跑CED所提供的Signal Software以一10kHz頻率線上數位化。

[0203] 在全細胞紀錄後，脂肪細胞由紀錄滴管取出，並進性單一細胞RT-PCR分離。單一脂肪細胞之總RNA係根據操作手冊以Absolute Nanoprepr Kit(Stratagene)分離。

[0204] 所分離出的總RNA係以SuperscriptIII RT(Invitrogen)進行反轉錄。接著定量一小部分(約1/60)RT產物進行PCR以偵測GAPDH RNA的表現。將1/6總RT溶液作為複合-聚合酶鏈鎖反應(Multiplex PCR)的模版，包含ASIC族(包含7個ASIC亞型、TRPV1、P物質以及CGRP)或是脂肪標誌(包含FAS、FGF10、αP2、DLK-1、SMAF1、ETO、UCP1、UCP3、ACRP30、AdipoR1與R2、PPARγ以及PPARγ2)引子對組。複合-聚合酶鏈鎖反應之熱循環係為95°C 10分鐘，接著進行95°C 15秒以及60°C 1分鐘的35個循環。PCR產物(1/50體積)用以作為巢式PCR放大之模版，其用以檢驗一特殊基因是否被表現在單一細胞。另外一組引子，巢式引子，係為上述基因所設計。巢式PCR之熱循環係與複合-聚合酶鏈鎖反應相同。PCR產物係以4%的洋菜膠分析。巢式引子如下所示： ASIC1a sense
5' -GCCAACTTCCGTAGCTTCAAG-3'

[0205] ASIC1a antisense 5' -TACCGCGTGAAGACCACTTTG-3'

[0206] ASIC1b sense 5' -TGCTCGGGTTGGATGAGAGTG-3'

[0207] ASIC1b antisense 5' -GGAGCAATAGAGCAGCATGTC-3'

[0208] ASIC2a sense 5' -CCGAAGCAGTTCAGCATGCTGGAG-3'

[0209] ASIC2a antisense 5' -ATCCTCGCCTGAGTTAAACATG-3'

[0210] ASIC2b sense 5' -TGCCGCCGCGCCACTTCGAGG-3'

[0211] ASIC2b antisense 5' -ATCCTCGCCTGAGTTAAACATG-3'
[0212] ASIC3 sense 5' -TCTGGCAACACTCTGCTCCAGGAAG-3'
[0213] ASIC3 antisense 5' -ACTGGGAGCGGTAGGAGGCCTG-3'
[0214] ASIC4 sense 5' -GGGTGACACAGGACAGTCAG-3'
[0215] ASIC4antisense 5' -CAGCCAAGGTCTGAAAGGTC-3'
[0216] ASIC5 sense 5' -CCCTGGTTTTGCTGATGCTG-3'
[0217] ASIC5antisense 5' -TTCCCACAGGAGAAGACAAAC-3'
[0218] TRPV1 sense 5' -TCCACTGGTGTGAGACGCC-3'
[0219] TRPV1antisense 5' -CTTTGAACTCGCTGTCAGTC-3'
[0220] Substance P sense 5' -GTGACCTCCCCAAAAGTAGA-3'
[0221] Substance P sense antisense 5' -ACAGGAGTCTCTGCTTCCAG-3'
[0222] CGRP sense 5' -GCCACCTGTGTGACTCATCG-3'
[0223] CGRP antisense 5' -GGCTTCAGAGCCCACATTGG-3'
[0224] FAS sense 5' -ATTGCATCAAGCAAGTGCAG-3'
[0225] FAS antisense 5' -GAGCCGTCAAACAGGAAGAG-3'
[0226] FGF10 sense 5' -CTGGAAAGCACTTGGGTCAT-3'
[0227] FGF10antisense 5' -GGAGACAGAATGCACAAGCA-3'
[0228] aP2 sense 5' -ACGACAGGAAGGTGAAGAGC-3'
[0229] aP2 antisense 5' -AAATTTCCATCCAGGCCTCT-3'
[0230] DLK-1 sense 5' -CTAACCCATGCGAGAACGAT-3'
[0231] DLK-1 antisense 5' -CTTGCACAGACACTCGAAGC-3'
[0232] SMAF1 sense 5' -CTGAGTGTGGCTGTGAGGAG-3'
[0233] SMAF1antisense 5' -CAGGTCTGACAACGGGAGAT-3'
[0234] ETO sense 5' -CCTGTCAATCCAGACCCAGT-3'
[0235] ETO antisense 5' -TGTCATGGGCTTTTCTCTCTG-3'
[0236] UCP-1 sense 5' -GGCCCTTGTAACAACAAAATAC-3'
[0237] UCP-1 antisense 5' -GGCAACAAGAGCTGACAGTAAAT-3'
[0238] UCP-3 sense 5' -ACTCCAGCGTCGCCATCAGGATTCT-3'
[0239] UCP-3 antisense 5' -TAAACAGGTGAGACTCCAGCAACTT-3'
[0240] ACRP30 sense 5' -GTTGCAAGCTCTCCTGTTCC-3'
[0241] ACRP30 antisense 5' -TCTCTCCAGGAGTGCCATCT-3'
[0242] AdipoR1 sense 5' -TCTCCTGGCTCTTCCACACT-3'
[0243] AdipoR1 antisense 5' -CCACAATGATGGCAGAGATG-3'
[0244] AdipoR2 sense 5' -TGGAGGCTGTTGGTAGTGAG-3'
[0245] AdipoR2 antisense 5' -TCTTAGGGAACCGAATCACC-3'
[0246] PPAR γ sense 5' -GGAATCAGCTCTGTGGACCT-3'
[0247] PPAR γ antisense 5' -TGGGTCAGCTCTTGTGAATG-3'
[0248] PPAR γ 2 sense 5' -CTCCTGTTGACCCAGAGCATG-3'
[0249] PPAR γ 2 antisense 5' -GTGGAGCAGAAATGCTGGAG-3' .

- [0250] 以9、16、25週大的小鼠測試葡萄糖耐受性(GTT)，而18或27週大的小鼠係用以測試胰島素耐受性(ITT)。為測試GTT，小鼠禁食隔夜接著腹膜(intraperitoneally)注射葡萄糖每一體重1.5 mg/g。為測試ITT，小鼠自由給予食物，並腹腔注射胰島素每一體重0.5 mU/g。由尾靜脈抽血測量含葡萄糖程度。為研究ASIC3抑制劑之功效，將水楊酸(salicylic acid)(14mg/kg)或APETx2(0.23mg/kg)和葡萄糖或胰島素一起腹腔注射。
- [0251] 從每一小鼠分離Perivovarian WAT，並以布林溶液(Bouin's solution)(Sigma)固定於室溫24小時。接著被固定的組織以石蠟包埋，切成5- μ m切片，並以蘇木精(hematoxylin)和伊紅(eosin)染色。WAT的型態分析係利用MettaMorph Offline software(Universal Imaging Corporation)分析源自3-4不同動物之各種年齡層和各種基因型之1000或更多細胞。
- [0252] 目前研究發現ASIC3^{-/-}小鼠相較於ASIC3^{+/+}具有較小體型，而ASIC3^{-/-}小鼠當其老化時，相較於ASIC3^{+/+}(n=10-22, p<0.05)並不會囤積大量體脂肪。8週大的ASIC3^{-/-}小鼠其白脂肪組織與棕脂肪組織細胞與ASIC^{+/+}並無顯著不同。但是在25週時，ASIC^{-/-}的白脂肪組織之細胞會充滿小脂肪細胞，有些會含有多房性脂肪堆積。相反的，棕脂肪組織則和ASIC3^{+/+}沒有甚麼不同。25週大的ASIC3^{-/-}小鼠的脂肪細胞平均大小($1018 \pm 20 \mu\text{m}^2$)遠小於相同年紀的ASIC3^{+/+}小鼠，與8週大之小鼠一樣(ASIC3^{+/+}為 $1877 \pm 39 \mu\text{m}^2$ ；ASIC3^{-/-}為 $1897 \pm 41 \mu\text{m}^2$)。
- [0253] 由於小脂肪細胞通常顯示胰島素敏感度增加(Um *et al.*, Nature 431, 200-205, 2004 and Komazawa *et al.*, Nat. Medicine 10, 1208-1215, 2004)，實驗將比較ASIC3^{+/+}與ASIC3^{-/-}小鼠(每一組n=6-9)的葡萄糖耐受性(GTT)與胰島素耐受性(ITT)。當動物老化，ASIC3^{-/-}小鼠相較ASIC3^{+/+}小鼠顯示較佳的葡萄糖耐受性與胰島素耐受性(P<0.05, Mann-Whitney test)。相反地，年輕小鼠(9-18週)的葡萄糖耐受性與胰島素耐受性在兩種基因型並無不同。然而，較老的ASIC3^{+/+}小鼠(25週, n=6)在葡萄糖耐受性與胰島素耐受性顯示較差的結果，即相較於年輕老鼠(9或16週, n=6或7)(P<0.05)為葡萄糖耐受不良。27週大的ASIC3^{+/+}小鼠其ITT只有細微改變。此一年紀的ASIC3^{-/-}小鼠其葡萄糖耐受並未受損但胰島素敏感度有改善。不同地，ASIC3^{-/-}小鼠不會產生與老化有關之葡萄糖耐受受損(例如葡萄糖耐受不良)。令人訝異的事，年紀較大的ASIC3^{-/-}小鼠其ITT較年輕小鼠佳(n=6, *P<0.05)。相較於ASIC3^{+/+}小鼠，ASIC3^{-/-}小鼠似乎可以隨著年齡藉由改善胰島素反應維持正常葡萄糖代謝。
- [0254] 為了測試ASIC3篩選抑制劑是否可逆轉老化有關的葡萄糖耐受不良以及胰島素阻抗，我們於老化小鼠群中測試水楊酸與APETx2的效果。水楊酸與APETx2係被篩選為ASIC3不同動力學的拮抗劑(Diochot *et al.*, EMBO J. 23, 1516-1525, 2004 and Voille *et al.*, J. Neurosci. 21, 8026-8033, 2001)。由實驗發現，以高劑量水楊酸來治療可逆轉ASIC3^{+/+}小鼠中部分老化有關的葡萄糖耐受效

果，但對於胰島素耐受測試則無影響。相反地，ASIC3特殊胜肽抑制劑APETx2可有效逆轉老化ASIC3+/+小鼠中與老化有關的葡萄糖耐受效果且對於有效提升胰島素之敏感度，如ITT所示。水楊酸不同的效果可能歸因於與APETx2抑制ASIC3的動力效果不同或是可能歸因於IKK β 抑制效果不同所致。持續以水楊酸(120mg/kg/day)處理齧齒類動物可破壞IKK β 活性，並藉由使胰島素訊息敏感化逆轉肥胖或糖尿病引起的胰島素阻抗。

[0255] 為試驗為何去除ASIC3對於脂肪細胞有深遠的影響，我們測試ASIC3是否表現於白脂肪組織(WAT)。PCR結果顯示有ASIC1b、ASIC3、ASIC4以及ASIC5之表現。在初代WAT組織，我們偵測某些脂肪細胞ASIC3的免疫反應。在年輕的ASIC3+/+小鼠(9週大)，ASIC3平均表現於成熟脂肪細胞部分以及由WAT分離的基質血管層(stromal vascular fraction, SVF)。有趣的是，在老化的老鼠(30週)中WAT表現SVF的ASIC3 mRNA而非成熟脂肪細胞，顯著被正向調控(約11倍)。相反地，老化背根神經節(dorsal root ganglion; DRG)ASIC3的表現相較於年輕的DRG只有1/3。

[0256] 為確定WAT表現的ASIC3是否有功能，我們利用全細胞電位法測試由8-10週大的小鼠所分離之培養SVF細胞之酸性引發電流。實驗結果發現，酸(pH5.0)確實於SVF脂肪細胞引起向內的電流(持續的或雙相的)。此種酸引發電流對於篩選的ASIC3抑制劑，如水楊酸與APETx2敏感。測試8個脂肪細胞與71個子座狀細胞(stroma-like cell)。實驗發現酸刺激於5個脂肪細胞與40個子座狀細胞引起一向內電流。酸敏感脂肪細胞之型態、細胞大小(直徑由15.6-64.3 μ m)以及酸引發電流之動力學係多樣化。有些細胞顯示雙相電流，有些則具有持續電流。具有雙相電流之細胞的電生理特性與持續電流者在許多方面都不同，包含電容(35.8與83.7pF)、振幅(peak Amplitude)(314.1與57.6pA)、電流密度(8.1與2.5pQ/pF)以及上升時間(rising time)(33.6與885.8ms)。酸引起雙相電流只在子座狀細胞發現。

[0257] 無動作電位(action potential)可以在這些脂肪細胞被引發，顯示其並未被腸神經節(enteric ganglia)，或平滑肌肉細胞所污染。表一整理脂肪細胞的細胞大小以及電生理特性，比較具有持續性電流和雙相電流的細胞。* *P<0.01, t-test。

[0258] 表一

	直徑(μ m)	V _m (mV)	電容 (pF)	振幅 (pA)	電流密度 (pQ/pF)	上升時間 (ms)
持續性 (n=31)	28.2±2.3	-18.6±2.3	83.7±10.6	57.6±10.6	2.5±0.4	885.8±104.7
雙相性 (n=14)	23.8±2.2	-14.6±2.9	35.8±4.4**	314.1±63.2**	8.1±2.3**	33.6±10.1**
無電流 (n=34)	24.1±1.6	-13.6±3.4	37.6±3.7			

[0259] WAT表現的ASIC3主要由ASIC3同聚肽(homomeric)通道組成，在全細胞電位記錄後經單一細胞RT-PCR推測而知。ASIC3-ASIC1b以及ASIC3-ASIC2b雜聚肽(heteromeric)通道被發現位於脂肪細胞一小

部分(約3/14)。酸敏感脂肪細胞也表現於許多脂肪細胞標誌，包含FAS、FGF10、aP2、ETO、PPAR γ 、AdipoR1與AdipoR2。AdipoR2是唯一表現於所有酸引發電流之細胞種類。令人出乎意料的是，3個無酸引發向內電流之細胞也表現ASIC3，顯示細胞需要額外的分子幫助ASIC3形成一功能性通道。表二整理具有或不具酸引發向內電流之細胞其單一細胞RT-PCR之分子特性。脂肪細胞根據ASIC3為同聚肽或雜聚肽通道次分類。括弧內之數字係顯示表現每一脂肪細胞基因標示的細胞數目。

[0260] 表二

酸引發向內電流	ASIC 基因	脂肪細胞標誌和其他基因	細胞數目
持續性	ASIC3	CGRP (1), FAS (2), FGF10 (1), aP2 (1), ETO (1), ACRP30 (1), PPAR γ (1), AdipoR1 (2), AdipoR2 (3)	7
	ASIC1b, ASIC3	aP2 (1), AdipoR2 (1) 2	2
雙相性	ASIC3	CGRP (1), FAS (1), FGF10 (2), AdipoR1 (1), AdipoR2 (1), PPAR γ (1)	4
	ASIC2b, ASIC3	AdipoR2 (1)	
無電流	ASIC3	FAS (1)	1
	ASIC1b, ASIC3	FAS (1), FGF10 (1), PPAR γ (1), UCP3 (1)	2

[0261] 上述結果顯示，脂肪組織的細胞表現功能性ASIC3通道也許會造成老化相關的葡萄糖耐受不良以及胰島素阻抗。去除或抑制此一通道可增加老化小鼠的胰島素敏感度。ASIC3 $^{-/-}$ 小鼠的體型比ASIC3 $^{+/+}$ 小鼠小並伴隨著與老化有關且有利的表現型：較低的內臟脂肪量、較小的脂肪細胞、較佳的GTT與ITT數據。這些有利的ASIC3 $^{-/-}$ 小鼠表現型並非導因節食，這些老鼠皆有正常進食。相反地，ASIC3 $^{+/+}$ 小鼠因老化導致葡萄糖耐受不良係與WAT表現ASIC3被正向調控有關。脂肪細胞而非初級感覺神經原傳入的ASIC3訊息，可能導致與老化有關的葡萄糖耐受不良，因為ASIC3在背根神經節的表現隨著年紀而衰減。

[0262] ASIC3是最敏感的第三型酸敏感性離子通道蛋白(pH0.5活化至約6.7)主要表現於初級感覺神經原，特別是在代謝感知相關的感覺神經原(metaboreceptive sensory neurons)或是局部缺血感知神經原。這也是為什麼質子感應原ASIC3媒介脂肪組織的訊息與乳酸有關。

[0263] 由缺氧代謝而產生的乳酸係為第三型酸敏感性離子通道有力的加強子(Immke and MacCleskey, Nat. Neurosci. 4, 869-870, 2001)

[0264] 除了疲勞的肌肉或局部缺血，脂肪組織，尤其是老化以及肥胖之個體，會活躍地產生乳酸作為葡萄糖代謝產物。老化肥胖的齧齒類動物之較大的脂肪細胞將所攝取的葡萄糖中總量的40%-50%轉化成乳酸，相較於年輕齧齒類動物，其葡萄糖對乳酸的轉化率為5%-15%。然而，脂肪細胞乳酸的角色目前依然不清楚，因為傳統糖質新生的

觀念無法解釋其如何於老化肥胖的個體活躍地產生。因此，乳酸也許是一個訊息化合物其協調細胞與系統功能。因為在有顯示胰島素阻抗的糖尿病個體一貫地發現乳酸之基礎值上升，脂肪細胞的ASIC3活性也許是乳酸訊號媒介的失落連結。ASIC3將缺血感覺神經原去極化時與乳酸的反應較其他酸好。因此，這些神經原也許作為代謝接受器以偵測組織(例如脂肪組織)的缺氧代謝，引發肌肉及心臟的酸連結疼痛感知(Chen *et al.*, 2002)。由於乳酸不會在很多其他之組織導致疼痛，因此ASIC3的功能也許不只是一疼痛偵測器，也監測組織的代謝狀態。當pH從7.4降至7.0時ASIC3通道會打開，當生理酸鹼值接近pF7.4時，乳酸會加強ASIC3通道的打開(Immke and McCleskey, Neuron 37, 75-84, 2003)。具有偵測乳酸酸中毒的能力，老化或肥胖個體的脂肪細胞的WAT表現ASIC3也許會持續活化，其中約有50%的葡萄糖代謝為乳酸。當WAT表現ASIC3也增加時，由WAT表現ASIC3所媒介的強化訊號也許會阻礙細胞吸收葡萄糖導致胰島素阻抗隨著老化產生。缺乏ASIC3時，脂肪組織無法適當地偵測乳酸且會將細胞導向加強胰島素敏感度。

[0265] 老化可以導致循環系統中的乳酸偏高並減少胰島素敏感度。當生理老化時，對胰島素反應的阻抗以及葡萄糖耐受降低會導致普遍流行於老人的第二型糖尿病。第二型糖尿病是在全世界老年族群中最普遍的代謝疾病，與粒腺體功能障礙有關。因為粒腺體功能障礙會將細胞轉化至缺氧性葡萄糖代謝並增加乳酸產生，乳酸感應器ASIC3可能在控制老化有關的糖代謝中扮演其中的一個角色。

[0266] 人類ASIC3位於染色體位置7q36(de Weille *et al.*, FEBS Lett. 433, 257-260, 1998)，其被確認為靠近葡萄糖、胰島素以及胰島素阻抗定量特徵基因座之一(An *et al.*, Diabetes 54, 909-914, 2005)。

[0267] 綜上所述，上述結果推測將WAT表現ASIC3訊息阻卻對於控制老化有關的胰島素阻抗以及第二型糖尿病的控制是有用的。

[0268] 本發明之實施方法已詳述於前述實施例中，任何熟悉本技術領域之人士皆可依本發明之說明，在不背離本發明之精神與範圍內視需要更動、修飾本發明，因此，其他實施態樣亦包含在本發明之申請專利範圍中

【圖式簡單說明】

【主要元件符號說明】

【序列式】

[0269]

[0270]

[0271]

[0272]

[0273]

[0274]

[0275]

[0276]

[0277]

[0278]

[0279]

[0280]

[0281]

[0282]

[0283]

[0284]

[0285]

[0286]

[0287]

[0288]

[0289]

[0290]

[0291]

[0292]

[0293]

[0294]

[0295]

[0296]

[0297]

[0298]

[0299]

[0300]

[0301]

[0302]

[0303]

[0304]

[0305]

[0306]

[0307]

[0308]

[0309]

[0310]

[0311]

[0312]

[0313]

[0314]

[0315]

- [0316]
- [0317]
- [0318]
- [0319]
- [0320]
- [0321]
- [0322]
- [0323]
- [0324]
- [0325]
- [0326]
- [0327]
- [0328]
- [0329]
- [0330]
- [0331]
- [0332]
- [0333]
- [0334]
- [0335]
- [0336]
- [0337]
- [0338]
- [0339]
- [0340]
- [0341]
- [0342]
- [0343]
- [0344]
- [0345]
- [0346]
- [0347]
- [0348]
- [0349]
- [0350]
- [0351]
- [0352]
- [0353]
- [0354]

[0355]

[0356]

[0357]

[0358]

[0359]

[0360]

[0361]

[0362]

[0363]

[0364]

[0365]

[0366]

[0367]

[0368]

[0369]

[0370]

[0371]

[0372]

[0373]

[0374]

[0375]

[0376]

[0377]

[0378]

[0379]

[0380]

[0381]

[0382]

[0383]

[0384]

[0385]

[0386]

[0387]

[0388]

[0389]

[0390]

[0391]

[0392]

[0393]

- [0394]
- [0395]
- [0396]
- [0397]
- [0398]
- [0399]
- [0400]
- [0401]
- [0402]
- [0403]
- [0404]
- [0405]
- [0406]
- [0407]
- [0408]
- [0409]
- [0410]
- [0411]
- [0412]
- [0413]
- [0414]
- [0415]
- [0416]
- [0417]
- [0418]
- [0419]
- [0420]
- [0421]
- [0422]
- [0423]
- [0424]
- [0425]
- [0426]
- [0427]
- [0428]
- [0429]
- [0430]
- [0431]
- [0432]

[0433]

[0434]

[0435]

[0436]

[0437]

[0438]

[0439]

[0440]

[0441]

[0442]

[0443]

[0444]

[0445]

[0446]

[0447]

[0448]

[0449]

[0450]

[0451]

[0452]

[0453]

[0454]

[0455]

[0456]

[0457]

[0458]

[0459]

[0460]

[0461]

[0462]

[0463]

[0464]

[0465]

[0466]

[0467]

[0468]

[0469]

[0470]

[0471]

[0472]

[0473]

[0474]

[0475]

[0476]

[0477]

[0478]

[0479]

[0480]

[0481]

[0482]

[0483]

[0484]

[0485]

[0486]

[0487]

[0488]

[0489]

[0490]

[0491]

[0492]

[0493]

[0494]

[0495]

[0496]

[0497]

[0498]

[0499]

[0500]

[0501]

[0502]

[0503]

[0504]

[0505]

[0506]

[0507]

[0508]

[0509]

[0510]

[0511]

[0512]

[0513]

[0514]

[0515]

[0516]

[0517]

[0518]

[0519]

[0520]

[0521]

[0522]

[0523]

[0524]

[0525]

[0526]

[0527]

[0528]

[0529]

[0530]

[0531]

[0532]

[0533]

[0534]

[0535]

[0536]

[0537]

[0538]

[0539]

[0540]

[0541]

[0542]

[0543]

[0544]

[0545]

[0546]

[0547]

[0548]

[0549]

[0550]

[0551]

[0552]

[0553]

[0554]

[0555]

[0556]

[0557]

[0558]

[0559]

[0560]

[0561]

[0562]

[0563]

[0564]

[0565]

[0566]

[0567]

[0568]

[0569]

[0570]

[0571]

[0572]

[0573]

[0574]

[0575]

[0576]

[0577]

[0578]

[0579]

[0580]

[0581]

[0582]

[0583]

[0584]

[0585]

[0586]

[0587]

[0588]

- [0589]
- [0590]
- [0591]
- [0592]
- [0593]
- [0594]
- [0595]
- [0596]
- [0597]
- [0598]
- [0599]
- [0600]
- [0601]
- [0602]
- [0603]
- [0604]
- [0605]
- [0606]
- [0607]
- [0608]
- [0609]
- [0610]
- [0611]
- [0612]
- [0613]
- [0614]
- [0615]
- [0616]
- [0617]
- [0618]
- [0619]
- [0620]
- [0621]
- [0622]
- [0623]
- [0624]
- [0625]
- [0626]
- [0627]

[0628]

[0629]

[0630]

[0631]

[0632]

[0633]

[0634]

[0635]

[0636]

[0637]

[0638]

[0639]

[0640]

[0641]

[0642]

[0643]

[0644]

[0645]

[0646]

[0647]

[0648]

[0649]

[0650]

[0651]

[0652]

[0653]

[0654]

[0655]

[0656]

[0657]

[0658]

[0659]

[0660]

[0661]

[0662]

[0663]

[0664]

[0665]

[0666]

[0667]

[0668]

[0669]

[0670]

[0671]

[0672]

[0673]

[0674]

[0675]

[0676]

[0677]

[0678]

[0679]

[0680]

[0681]

[0682]

[0683]

[0684]

[0685]

[0686]

[0687]

[0688]

[0689]

[0690]

[0691]

[0692]

[0693]

[0694]

[0695]

[0696]

[0697]

[0698]

[0699]

[0700]

[0701]

[0702]

[0703]

[0704]

[0705]

- [0706]
- [0707]
- [0708]
- [0709]
- [0710]
- [0711]
- [0712]
- [0713]
- [0714]
- [0715]
- [0716]
- [0717]
- [0718]
- [0719]
- [0720]
- [0721]
- [0722]
- [0723]
- [0724]
- [0725]
- [0726]
- [0727]
- [0728]
- [0729]
- [0730]
- [0731]
- [0732]
- [0733]
- [0734]
- [0735]
- [0736]
- [0737]
- [0738]
- [0739]
- [0740]
- [0741]
- [0742]
- [0743]
- [0744]

- [0745]
- [0746]
- [0747]
- [0748]
- [0749]
- [0750]
- [0751]
- [0752]
- [0753]
- [0754]
- [0755]
- [0756]
- [0757]
- [0758]
- [0759]
- [0760]
- [0761]
- [0762]
- [0763]
- [0764]
- [0765]
- [0766]
- [0767]
- [0768]
- [0769]
- [0770]
- [0771]
- [0772]
- [0773]
- [0774]
- [0775]
- [0776]
- [0777]
- [0778]
- [0779]
- [0780]
- [0781]
- [0782]
- [0783]

- [0784]
- [0785]
- [0786]
- [0787]
- [0788]
- [0789]
- [0790]
- [0791]
- [0792]
- [0793]
- [0794]
- [0795]
- [0796]
- [0797]
- [0798]
- [0799]
- [0800]
- [0801]
- [0802]
- [0803]
- [0804]
- [0805]
- [0806]
- [0807]
- [0808]
- [0809]
- [0810]
- [0811]
- [0812]
- [0813]
- [0814]
- [0815]
- [0816]
- [0817]
- [0818]
- [0819]
- [0820]
- [0821]
- [0822]

[0823]

[0824]

七、申請專利範圍：

1. 一種用以治療胰島素阻抗之醫藥組合物，其係包含：有效量之第三型酸敏感性離子通道蛋白3(acid sensing ion channel 3, ASIC3)的抑制劑；及藥學上可接受之添加劑；其中，前述抑制劑係為蛋白質、胜肽、模擬肽、類肽、抗體、小分子、藥物、反義核酸或干擾RNA。
2. 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中前述胜肽為APETx2。
3. 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中前述添加劑係為溶劑、分散劑、抗生素、抗黴菌劑、等滲透壓與延遲吸收劑或其組合。
4. 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其為膠囊、凝膠密合或片劑。
5. 一種ASIC3抑制劑於製備治療胰島素阻抗之醫藥組合物之用途，其中前述醫藥組合物包含：有效量之ASIC3抑制劑；及藥學上可接受之添加劑；其中，前述抑制劑係為蛋白質、胜肽、模擬肽、類肽、抗體、小分子、藥物、反義核酸或干擾RNA。
6. 如申請專利範圍第5項所述之用途，其中前述胜肽為APETx2。
7. 一種用以治療胰島素阻抗之套裝產品，其係包含：如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物；一容器；及一前述醫藥組合物的使用說明。

八、圖式：