

# 發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95100671

※申請日期：95.5.5

※IPC分類：A61K 38/43 (2006.01)

A61P 3/10

一、發明名稱：(中文/英文)

供降低糖尿病患者血糖之複合物

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立交通大學

Nation Chiao Tung University

代表人：(中文/英文)

張俊彥 / CHANG, CHUN YEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

新竹市大學路1001號

1001 Ta-Hsueh Rd., Hsinchu, Taiwan, 30010,R.O.C

國籍：(中文/英文)

中華民國 / Taiwan, R.O.C.

三、發明人 (共 2 人)

姓名：(中文/英文)

張正 / CHANG, CHENG

林穎男 / LIN, YING NAN

國籍：(中文/英文)

中華民國 / Taiwan, R.O.C.

中華民國 / Taiwan, R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

**五、中文發明摘要：**

一種供降低糖尿病患者血糖之複合物，其具有運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子），當運鐵蛋白將金屬離子（或氧化金屬離子）送進細胞時，可促使細胞吸收葡萄糖，並且降低金屬離子（或氧化金屬離子）單獨存在時的生理毒性。另外，本發明之複合物具有降低胰島素抗阻性的作用，可進一步用於治療第二型糖尿病之高血糖及降低胰島素抗阻性。

**六、英文發明摘要：**

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種治療糖尿病之複合物，特別是一種供降低糖尿病患者血糖之複合物，其具有運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）。

### 【先前技術】

糖尿病（Diabetes Mellitus）是一種新陳代謝異常的疾病（disorder of metabolism）。其成因是體內胰臟所分泌的胰島素不足，或分泌正常但功能不佳的情況下，使血糖無法被正常利用，所引發的疾病。第一型糖尿病是一種自體免疫疾病（Autoimmune Disease），是由於身體的免疫系統對自身作出攻擊而成的。糖尿病患者的免疫系統對自身分泌胰島素的胰臟 $\beta$ 細胞（pancreatic beta cells）作出攻擊並殺死他們。結果使胰臟不能分泌足夠的胰島素。第二型糖尿病的患者通常能夠分泌足夠的胰島素，但因為身體產生了胰島素阻抗性（insulin resistance）和胰臟 $\beta$ 細胞功能不全（ $\beta$  cell dysfunction），所以使身體不能有效使用胰島素。

目前用於治療糖尿病的方式可分為非藥物治療與藥物治療兩種。在非藥物治療方面，主要是藉飲食調控和運動的方式來加以治療。運動所造成的肌肉收縮，可促使細胞之葡萄糖輸送蛋白-4（Glucose transporter 4，GLUT4）移至細胞膜表面，促使葡萄糖的吸收。而且，此機制與人體一般利用胰島素來刺激細胞吸收的機制並不相同，且此機制在第二型糖尿病中並未受損。而在藥

物治療方面，主要的目的是使不足的胰島素上升、調降進食後的高血糖和改善胰島素抗阻性。所以，依此目標而產生的治療方式和藥物主要有胰島素相關治療、口服降血糖藥物（oral hypoglycemic agents, OHA）和聯合藥物治療。目前用於治療糖尿病的藥物主要分為 Sulphonylureas（SU）和 Biguanides（BG）兩大類。SU 降血糖最主要之機制為促進胰臟胰島素之分泌，特別是加強胰臟  $\beta$  細胞對葡萄糖刺激而釋放胰島素之作用。BG 本身不會刺激胰島素之分泌，其控制血糖機轉為抑制食慾、延緩腸道吸收葡萄糖、促進葡萄糖在腸道之厭氧性分解作用而增加葡萄糖在腸道中之利用、加強胰島素在肝臟之作用，以及促使貯藏於細胞內的葡萄糖輸送蛋白 GLUT4 跑到細胞表面來參與輸送工作，而加速葡萄糖的代謝。但上述之降血糖藥物在長期使用後均會有失活的現象發生。

目前已知金屬離子與糖尿病有某些相關性。例如鋅離子可活化胰島素的活性。鈷離子之錯合物（Cobalt(II) 和 cobalt(III) dipicolinate complexes）有類似胰島素的活性，但這類的物質會穩定地累積在身體中，而引發副作用。另外，目前發現在糖尿病的患者中，鉻離子的含量均較一般人少，若適量補充鉻離子可幫助糖尿病患者調控血糖。日常飲食攝取之礦物質鉻可以分為無機鉻與有機鉻複合物。無機鉻的吸收率非常的低，僅有 0.4% 至 3%，原因是其在消化道內很容易形成氫橋合（olation）作用，而產生龐大的錯合物阻礙腸道的吸收。因此於美國第 6379693 號專利案

中揭示一種三價鉻 ( $\text{Cr}^{3+}$ ) 與乳鐵蛋白 (lactoferrin) 之複合物，其使用方式為混在奶粉中一起食用，以減低金屬離子之生理毒性並有利消化道之吸收。因乳鐵蛋白可抵抗腸胃道蛋白酶的消化和在 pH 值約為 3.5 時才會把金屬離子釋放出來，所以乳鐵蛋白可有效將金屬離子攜入腸胃道細胞中，但乳鐵蛋白經由胞噬作用進入腸胃道細胞之後，會被溶酶體 (lysosome) 分解，而金屬離子則會釋放至血液當中，再藉由運鐵蛋白 (transferrin) 攜帶進入細胞當中利用。因此鉻離子並非以三價鉻與乳鐵蛋白之複合物的模式經由循環系統被運送到身體其他的器官組織中 (不包括腸道細胞)。另外，若直接使用金屬離子進行治療，可能會使其穩定的累積在身體中，因而造成金屬中毒的現象。

運鐵蛋白是運送鐵離子的蛋白，主要由肝細胞 (hepatocytes) 製造，在血液中的含量為每毫升 2.5 毫克。運鐵蛋白存在於血液 (blood)、膽汁 (bile)、羊膜液 (amniotic fluid)、腦脊髓液 (cerebrospinal fluid)、淋巴 (lymph)、初乳 (colostrums) 和乳汁。運鐵蛋白可與  $\text{Fe}^{3+}$  (鐵離子)、 $\text{Cu}^{2+}$  (銅離子)、 $\text{Zn}^{2+}$  (鋅離子)、 $\text{Mn}^{3+}$  (錳離子)、 $\text{Co}^{3+}$  (鈷離子)、 $\text{V}^{3+}$  (釩離子)、 $\text{Cr}^{3+}$  (鉻離子) 等金屬離子結合，且結合位置相同。運鐵蛋白和鐵離子之複合物與細胞上的運鐵蛋白受器 (receptor) 結合，藉由胞噬作用 (endocytosis) 進入細胞內，形成核內體 (endosome)。然後，核內體上的腺嘌呤核苷三磷酸依存性之氫離子幫浦 (ATP-dependent proton pump) 把細胞質內的質子 (proton) 送入核內體，以降低

核內體的 pH 值，當 pH 值降到 5.5 時，運鐵蛋白與鐵離子就會分開，運鐵蛋白會隨運鐵蛋白受體重回細胞表面釋出再利用，而鐵離子則會留在細胞內利用之。

綜合上述所言，降血糖藥物在長期使用後會有失活現象，直接使用金屬離子來作治療則會造成金屬中毒，金屬離子以錯合物的型態進入身體則會穩定地累積在身體中而引發副作用。另外，乳鐵蛋白雖可與金屬離子形成複合物以降低生理毒性，但於消化道中會被分解而無法維持複合物之結構。因此提供一種金屬離子之複合物，用以降低生理毒性並可有效運送金屬離子進入細胞以促進細胞吸收葡萄糖之能力，方可達成降低糖尿病患者血糖之功效。

#### 【發明內容】

有鑑於先前技術所存在之問題，本發明提供一種供降低糖尿病患者血糖之複合物，用以有效運送金屬離子進入細胞以促進細胞吸收葡萄糖之能力，進而達成降低糖尿病患者血糖之功效。

本發明所揭露之供降低糖尿病患者血糖之複合物，其具有運鐵蛋白與金屬離子(或氧化金屬離子)，當運鐵蛋白將金屬離子(或氧化金屬離子)送進細胞時，可促使細胞吸收葡萄糖，並且降低金屬離子(或氧化金屬離子)單獨存在時的生理毒性。另外，本發明之複合物具有降低胰島素抗阻性的作用，可進一步用於治療第二型糖尿病之高血糖及降低胰島素抗阻性。

以下在實施方式中詳細敘述本發明之詳細特徵以及優點，其



內容足以使任何熟習相關技藝者了解本發明之技術內容並據以實施，且根據本說明書所揭露之內容、申請專利範圍及圖式，任何熟習相關技藝者可輕易地理解本發明相關之目的及優點。

### 【實施方式】

為使對本發明的目的、構造、特徵、及其功能有進一步的瞭解，茲配合實施例詳細說明如下。以上之關於本發明內容之說明及以下之實施方式之說明係用以示範與解釋本發明之原理，並且提供本發明之專利申請範圍更進一步之解釋。於本案中使用的標題、副標題、粗體字與斜體字係為方便讀者閱讀，不用以限定本發明之專利保護範圍。

本發明之供降低糖尿病患者血糖之複合物，其具有運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子），當運鐵蛋白將金屬離子（或氧化金屬離子）送進細胞時，可促使細胞吸收葡萄糖，並且降低金屬離子（或氧化金屬離子）單獨存在時的生理毒性。不同的金屬離子與運鐵蛋白在形成複合物的反應中會有不同的平衡時間點。一般而言 apo-transferrin（apo-是指運鐵蛋白釋放掉結合的鐵離子後的缺失狀態）可與兩個金屬離子結合。Apo-transferrin 的 N 端葉（N-lobe）和 C 端葉（C-lobe）是利用兩個酪氨酸（Tyr）、一個天門冬氨酸（Asp）和一個組氨酸（His）的位置來與金屬離子接合，金屬離子剛進入 N-lobe 或 C-lobe 時，是先跟 Tyr 結合。未與金屬離子結合之 Tyr 的紫外光（UV）吸收波長是 274.5 奈米。若 Tyr 與金屬離子結合後，會使波長 274.5 奈米的吸光值消失，而出現

其他波長的吸光值。因此測量吸光值即可知道反應是否完成。

### 第一實施例：運鐵蛋白與 $\text{Co}^{3+}$ 之複合物

備製三價鈷溶液：先把硝酸鈷 ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 溶液和過量的 35% 過氧化氫 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 混和後，緩慢加入泥狀的碳酸氫鈉 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 溶液中，並保持整個實驗在  $0^\circ\text{C}$  下進行 1 小時。顏色會由磚紅色變為橄欖綠色，然後收集橄欖綠色的產物，此產物為碳酸鈷鈉化合物 ( $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )。將  $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{CO}_3)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶在 1 莫耳濃度的  $\text{NaHCO}_3$  溶液中，放置室溫下 2 小時再以過濾抽氣漏斗收集產物，接著靜置在室溫下三天再過濾一次以收集產物，此產物即可成為三價鈷溶液。

三價鈷溶液與運鐵蛋白反應：將三價鈷溶液與溶在 0.01 莫耳濃度的三羥甲基氨基甲烷緩衝液 (Tris buffer, 含 0.01 莫耳濃度的碳酸氫鈉 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 且 pH 值為 7.4) 中的 apo-transferrin 以三比一的莫耳數比例混合之，同時並測定 pH 值是否維持在 7.4，操作的環境溫度為  $25^\circ\text{C}$ 。在適當的時間下測量混合物之 UV 吸光值。待其吸光值不再變化時，即可停止實驗。

去除多餘三價鈷離子：利用 Hi-trap<sup>TM</sup> 管柱來分離未結合的  $\text{Co}^{3+}$  和運鐵蛋白與  $\text{Co}^{3+}$  之複合物。這是利用 Hi-trap<sup>TM</sup> 管柱內所填充的樹酯的孔徑不同來分離不同大小的  $\text{Co}^{3+}$  與複合物。如此可獲得運鐵蛋白與  $\text{Co}^{3+}$  之複合物。

### 第二實施例：運鐵蛋白與 $\text{Cr}^{3+}$ 之複合物

預先備製三價鉻溶液，再參考第一實施例之方法使三價鉻溶

液和運鐵蛋白反應，最後再參考第一實施例之方法去除多餘的三價鉻離子，如此可獲得運鐵蛋白與  $\text{Cr}^{3+}$  之複合物。

### 第三實施例：運鐵蛋白與 $\text{VO}^{2+}$ 之複合物

預先備製二價氧化釩溶液，再參考第一實施例之方法使二價氧化釩溶液和運鐵蛋白反應，最後再參考第一實施例之方法去除多餘的二價氧化釩離子，如此可獲得運鐵蛋白與  $\text{VO}^{2+}$  之複合物。

以細胞實驗測試本發明之複合物之功效

#### 細胞分化與培養

於此使用  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞（一種老鼠肌纖維母細胞，Mouse myoblast cells）進行實驗。 $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞長至全滿之後（此時定義為第 0 天，Day 0），吸除一半舊的培養液，再加入一半新的分化液（99% 的 DMEM 培養液與 10% 的牛血清）。之後每 48 小時換一次培養液。一直到  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞由肌母細胞（myoblast）的型態分化成肌管（myotube）的型態即可。在正常的生理狀態中，肌肉是由 myoblast 分化形成 myotube，再由 myotube 聚集而成。所以，myotube 是最接近人體肌肉型態的細胞組織。故於實驗流程所用的細胞形態均是 myotube，以求接近正常生理之狀態。

#### 萃取細胞內葡萄糖並定量

在實驗前十六小時，將已分化  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  myotube 中舊的培養液去除，並用磷酸鹽緩衝液（Phosphate Buffer Saline, PBS）沖洗細胞一次後，加入無血清的培養液。實驗開始後，加入適當濃度的刺激樣品（包括單獨的  $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$  或  $\text{VO}^{2+}$  金屬離子，運鐵蛋白與

$\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$  或  $\text{VO}^{2+}$  之複合物，或胰島素等，刺激樣品溶於不含葡萄糖之 DMEM 培養液中)，並放在  $37^\circ\text{C}$  下 30 分鐘。30 分鐘之後加入 4 毫莫耳濃度的去氧葡萄糖 (2-Deoxy-D-glucose)，然後放在  $37^\circ\text{C}$  下 10 分鐘。最後將細胞放在冰上 10 分鐘以停止反應。

接著，去除舊的培養液，用冰的 PBS 沖洗細胞三次。沖完後，用冰的 65% 乙醇 (EtOH) 將細胞刮下，並利用超音波震盪將細胞打破後，以每分鐘 13000 轉 (rounds per minute, rpm) 之轉速於  $4^\circ\text{C}$  下離心 15 分鐘，取上清液至新的離心管中，而沉澱物再以上述步驟進行離心一次，把兩次的上清液混合，利用真空濃縮機將其抽乾。抽乾後產物利用分析用成套試劑 Amplex Red Glucose /Glucose Oxidase Assay Kit 來測定葡萄糖的量。

## 結果與討論

### 1. 單獨的金屬離子對 $\text{C}_2\text{C}_{12}$ myotube 吸收葡萄糖之影響(作為本發明之複合物的對照組實驗)

於實驗前先將  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  myoblast 細胞分化為 myotube，並於實驗前 16 小時，將細胞培養液換為無血清的培養液。並利用不同的金屬溶液來刺激細胞對葡萄糖吸收的反應。「第 1 圖」為  $\text{Cr}^{3+}$  溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖，如圖中所示，當細胞給予  $\text{Cr}^{3+}$  的刺激( $\text{Cr}^{3+}$  溶液濃度分別為 0.1 微莫耳濃度( $\mu\text{M}$ )、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$  與  $100\mu\text{M}$ ) 之後，相對於未加入 (沒有加任何刺激樣品) 而言，均可以提高細胞對葡萄糖的吸收能力。而其中以  $10\mu\text{M}$  和  $100\mu\text{M}$  的  $\text{Cr}^{3+}$  溶液對提高細胞吸收葡萄糖的能力最好，相較於未

加入而言，分別可以增加細胞吸收葡萄糖 2.21 和 2.41 倍。

「第 2 圖」為  $\text{VO}^{2+}$  溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖，如圖中所示，當細胞給予  $\text{VO}^{2+}$  的刺激（ $\text{VO}^{2+}$  溶液濃度分別為  $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$  與  $100\mu\text{M}$ ）之後，相對於未加入而言，均可以提高細胞對葡萄糖的吸收能力。而其中以  $10\mu\text{M}$  和  $100\mu\text{M}$  的  $\text{VO}^{2+}$  溶液對提高細胞吸收葡萄糖的能力最好，相較於未加入而言，分別可以增加細胞吸收葡萄糖 2.61 和 2.38 倍。

「第 3 圖」為  $\text{Co}^{3+}$  溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖，如圖中所示，當細胞給予  $\text{Co}^{3+}$  溶液的刺激（ $\text{Co}^{3+}$  溶液濃度分別為  $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$  與  $100\mu\text{M}$ ）之後，相對於未加入而言，均可以提高細胞對葡萄糖的吸收能力。而其中以  $100\mu\text{M}$  的  $\text{Co}^{3+}$  溶液對提高細胞吸收葡萄糖的能力最好，相較於未加入而言，可以增加細胞吸收葡萄糖 3.14 倍。但在給予  $\text{Co}^{3+}$  溶液刺激 30 分鐘之後，細胞的形態會發生變化，而且變的很容易漂浮起來。所以， $100\mu\text{M}$   $\text{Co}^{3+}$  溶液雖然對細胞吸收葡萄糖的刺激能力是最好的，但卻會造成細胞某種程度上的傷害。

「第 4 圖」為  $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$  和  $\text{VO}^{2+}$  三種溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖能力影響的比較結果圖。圖中相同花紋代表相同的金屬離子（或氧化金屬離子）溶液，於橫軸下方則標示其濃度。如圖中所示， $100\mu\text{M}$   $\text{Co}^{3+}$  溶液促進  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收收葡萄糖能力的效果是最好的，甚至  $\text{Co}^{3+}$  溶液在  $0.1\mu\text{M}$  時就可以達到  $100\mu\text{M}$   $\text{Cr}^{3+}$  溶液和  $100\mu\text{M}$   $\text{VO}^{2+}$  溶液所能達到的效果。整體而言  $\text{Co}^{3+}$  溶液對

增加  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖的能力是最好的，但高濃度的  $Co^{3+}$  溶液會對細胞造成傷害。

另外，目前發現一些降血糖的物質若和胰島素（insulin）一起使用的話可以增強細胞吸收葡萄糖的作用。因此分別探究  $Cr^{3+}$ 、 $VO^{2+}$  和  $Co^{3+}$  溶液與胰島素一起刺激下，對  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響。

「第 5 圖」為  $Cr^{3+}$  溶液和胰島素一起作用下對  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖，圖中相同花紋代表相同濃度之  $Cr^{3+}$  溶液，於橫軸下方則標示胰島素的濃度。如圖中所示，在  $0.1\mu M$   $Cr^{3+}$  的濃度下，以  $1\mu M$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 4.84 倍。在  $1\mu M$   $Cr^{3+}$  的濃度下，以  $1\mu M$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 3.71 倍。在  $10\mu M$   $Cr^{3+}$  的濃度下，以  $6pM$  ( $6 \times 10^{-6}\mu M$ ) 胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 2.36 倍。在  $100\mu M$   $Cr^{3+}$  的濃度下，以  $1\mu M$  胰島素共同處理效果最好，相對於未處理而言可增加 3.74 倍。

「第 6 圖」為  $VO^{2+}$  溶液和胰島素一起作用下對  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖，圖中相同花紋代表相同濃度之  $VO^{2+}$  溶液，於橫軸下方則標示胰島素的濃度。如圖中所示，在  $0.1\mu M$   $VO^{2+}$  的濃度下，以  $0.1\mu M$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 2.62 倍。在  $1\mu M$   $VO^{2+}$  的濃度下，以  $10\mu M$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 2.7 倍。在  $10\mu M$   $VO^{2+}$  的濃度下，以  $10\mu M$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而

言可增加 6.21 倍。在  $100\mu\text{M VO}^{2+}$  的濃度下，以  $1\mu\text{M}$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 3.4 倍。

「第 7 圖」為  $\text{Co}^{3+}$  溶液和胰島素一起作用下對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖，圖中相同花紋代表相同濃度之  $\text{Co}^{3+}$  溶液，於橫軸下方則標示胰島素的濃度。如圖中所示，在  $0.1\mu\text{M Co}^{3+}$  溶液的濃度下，以  $1\mu\text{M}$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 7.73 倍。在  $1\mu\text{M Co}^{3+}$  溶液的濃度下，以  $10\mu\text{M}$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 4.37 倍。在  $10\mu\text{M Co}^{3+}$  溶液的濃度下，以  $0.1\mu\text{M}$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 3.95 倍。在  $100\mu\text{M Co}^{3+}$  溶液的濃度下，以  $6\text{pM}$  胰島素共同處理效果最好，相對於未加入而言可增加 8.5 倍。可是在此濃度下的  $\text{Co}^{3+}$  溶液會使細胞型態改變，並造成細胞容易飄起等傷害。

由上述實驗可以得知，金屬離子（或氧化金屬離子）確實可以增加肌肉細胞對葡萄糖的吸收能力，其中又以  $\text{Co}^{3+}$  溶液的效果最好，但在  $100\mu\text{M}$  的  $\text{Co}^{3+}$  溶液作用下，細胞會發生型態上的改變，並易漂浮。若金屬離子（或氧化金屬離子）再與胰島素一起作用的話，對增加肌肉細胞對葡萄糖的吸收能力更佳。三種溶液中以  $\text{Co}^{3+}$  溶液與胰島素一起作用的效果最好，但在  $100\mu\text{M}$  的  $\text{Co}^{3+}$  溶液作用下，細胞亦會發生型態上的改變。

2. 本發明之運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  myotube 吸收葡萄糖之影響

由前述結果可知  $100\mu\text{M Co}^{3+}$  溶液對增加  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖能力有最好的效果，但是卻會造成細胞的形態的改變與傷害。所以本發明利用運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物來改善此現象。於生物體中，運鐵蛋白與鐵離子之複合物與細胞上的運鐵蛋白受器結合，藉由胞噬作用進入細胞內，形成核內體。然後，核內體上的 ATP-dependent proton pump 把細胞質內的質子送入核內體，以降低核內體的 pH 值，當 pH 值降到 5.5 時，運鐵蛋白與鐵離子就會分開，而運鐵蛋白會隨運鐵蛋白受體重回細胞表面釋出再利用。而鐵離子則會留在細胞內利用之，最後一群鐵離子會聚集成鐵蛋白（ferritin），而被溶酶體（lysosome）分解。運鐵蛋白的葉部（lobe）在一般狀況下是以開啟狀態（open state）為主，但有時會呈現關閉狀態（close state），但機會較少。 $\text{Fe}^{3+}$  和碳酸根離子（ $\text{CO}_3^{2-}$ ）會先與運鐵蛋白區域 2（domain2）上的兩個 Tyr 結合，然後進入關閉狀態，再與 Asp 和 His 結合，以維持關閉狀態。在運鐵蛋白中有一種  $\text{Fe}^{3+}$  的釋放機制。主要是在運鐵蛋白的 N 端葉的區域 1 和 2（domain 1 和 2）上各有一個賴氨酸（lysine）。在 N 端葉呈關閉狀態時，兩個 lysine 互不相斥，此時 N 端葉呈現一穩定的關閉狀態。但當 pH 值降低時，兩個 lysine 會因帶正電而互相排斥，此時 N 端葉呈現開啟的狀態，而  $\text{Fe}^{3+}$  釋出。本發明之複合物，即是利用運鐵蛋白將金屬離子（或氧化金屬離子）依上述機制送入細胞內，而金屬離子（或氧化金屬離子）再促使細胞吸收葡萄糖。於先前技術曾提出利用乳鐵蛋白與金屬



離子之複合物治療糖尿病（美國第 6379693 號專利案），但一般體細胞（例如肌肉細胞）表面缺乏乳鐵蛋白受器，使乳鐵蛋白之複合物無法以胞噬作用進入細胞內。但運鐵蛋白為人體血液中大量存在之蛋白，且一般人體肌肉細胞具有運鐵蛋白受器，可確實讓運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物在循環系統中以胞噬作用進入細胞內。且運鐵蛋白為人體血液所含之蛋白，可避免給藥時產生免疫反應等副作用。

「第 8 圖」為運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物對  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖。圖中相同花紋代表相同的複合物，於橫軸下方則標示複合物的濃度，如圖中所示，相對於未加入而言，濃度為每毫升 80 微克 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 的運鐵蛋白與  $\text{Cr}^{3+}$  之複合物 (Cr-TF) 可增加  $C_2C_{12}$  細胞吸收收葡萄糖能力 4.03 倍。濃度為  $40\mu\text{g/ml}$  的運鐵蛋白與  $\text{VO}^{2+}$  之複合物 (VO-TF) 可增加  $C_2C_{12}$  細胞吸收收葡萄糖能力 4.34 倍。而濃度為  $100\mu\text{g/ml}$  的運鐵蛋白與  $\text{Co}^{3+}$  之複合物 (Co-TF) 可增加  $C_2C_{12}$  細胞吸收收葡萄糖能力 4.97 倍。將「第 8 圖」之結果與「第 1 圖」、「第 2 圖」及「第 3 圖」之結果加以比較，發現金屬離子（或氧化金屬離子）若與運鐵蛋白結合以提供生物性攜帶的話，促進細胞吸收葡萄糖之效果均較單獨的金屬離子（或氧化金屬離子）來的好。而且，以運鐵蛋白與  $\text{Co}^{3+}$  之複合物的效果最好，且以運鐵蛋白與  $\text{Co}^{3+}$  之複合物的形式來刺激細胞的話，可以避免細胞發生形態的改變且避免傷害細胞。

「第 9 圖」為運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物和胰島素一起作用下對  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖。圖中相同花紋代表相同的複合物，於橫軸下方則標示複合物的濃度，且複合物濃度的下方標示有所加入胰島素的濃度。如圖中所示，相對於未加入而言濃度為  $40\mu\text{g/ml}$  的運鐵蛋白與  $\text{Cr}^{3+}$  之複合物（Cr-TF）與  $10\mu\text{M}$  胰島素一起作用下可增加  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖能力 4.94 倍。濃度為  $40\mu\text{g/ml}$  的運鐵蛋白與  $\text{VO}^{2+}$  之複合物（VO-TF）與  $10\mu\text{M}$  胰島素一起作用下可增加  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖能力 6.07 倍。而濃度為  $40\mu\text{g/ml}$  的運鐵蛋白與  $\text{Co}^{3+}$  之複合物（Co-TF）與  $10\mu\text{M}$  胰島素一起作用下可增加  $C_2C_{12}$  細胞吸收葡萄糖能力 7.01 倍。

用運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物的形式來刺激肌肉細胞與用單獨的金屬離子（或氧化金屬離子）來刺激肌肉細胞之比較結果如下。以  $\text{Cr}^{3+}$  離子而言，濃度為  $1\text{mM}$   $\text{Cr}^{3+}$  溶液能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 1.6 倍，而濃度為  $40\text{mg/ml}$  Cr-TF 溶液（其中所含  $\text{Cr}^{3+}$  的濃度約為  $1\text{mM}$ ）則能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 3.9 倍。以  $\text{VO}^{2+}$  離子而言，濃度為  $1\text{mM}$   $\text{VO}^{2+}$  溶液能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 1.9 倍，而濃度為  $40\text{mg/ml}$  VO-TF 溶液（其中所含  $\text{VO}^{2+}$  的濃度約為  $1\text{mM}$ ）則能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 4.4 倍。以  $\text{Co}^{3+}$  離子而言，濃度為  $1\text{mM}$   $\text{Co}^{3+}$  溶液能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 2.5 倍，而濃度為  $40\text{mg/ml}$  Co-TF 溶液（其中所含  $\text{Co}^{3+}$  的濃度約為  $1\text{mM}$ ）則能增加肌肉細胞

吸收葡萄糖能力為 3.0 倍。兩相比較之下，在刺激肌肉細胞吸收葡萄糖方面，發現以運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物的形式來刺激肌肉細胞比用單獨的金屬離子（或氧化金屬離子）來刺激肌肉細胞的效果要好。

運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物與胰島素一起刺激肌肉細胞，與單獨的金屬離子（或氧化金屬離子）和胰島素一起刺激肌肉細胞的結果比較如下。以  $\text{Cr}^{3+}$  離子而言，濃度為 1mM  $\text{Cr}^{3+}$  溶液與胰島素能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 1.3 倍，而濃度為 40mg/ml Cr-TF 溶液（其中所含  $\text{Cr}^{3+}$  的濃度約為 1mM）與胰島素則能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 5.0 倍。以  $\text{VO}^{2+}$  離子而言，濃度為 1mM  $\text{VO}^{2+}$  溶液與胰島素能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 2.7 倍，而濃度為 40mg/ml VO-TF 溶液（其中所含  $\text{VO}^{2+}$  的濃度約為 1mM）與胰島素則能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 6.1 倍。以  $\text{Co}^{3+}$  離子而言，濃度為 1mM  $\text{Co}^{3+}$  溶液與胰島素能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 4.4 倍，而濃度為 40mg/ml Co-TF 溶液（其中所含  $\text{Co}^{3+}$  的濃度約為 1mM）與胰島素則能增加肌肉細胞吸收葡萄糖能力為 7.1 倍。比較之下，當胰島素存在時，在刺激肌肉細胞吸收葡萄糖方面，仍然是以運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物的形式來刺激肌肉細胞比用單獨的金屬離子（或氧化金屬離子）來刺激肌肉細胞的效果要好。

由上述實驗可以得知利用運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物形式，在刺激肌肉細胞吸收葡萄糖方面，要比用

單獨的金屬離子（或氧化金屬離子）要好。若又伴隨有一定量的胰島素共同刺激的話，則更能增進肌肉細胞吸收葡萄糖的能力。因此利用本發明之運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物可以增加細胞吸收葡萄糖的能力，其在生理層面則可降低血糖，而達到治療糖尿病的效果。利用本發明之運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物可促進細胞吸收葡萄糖，其在生理層面之意義為減少生物組織器官週邊之體液的葡萄糖濃度，且降低單獨的金屬離子（或氧化金屬離子）對生理之毒性。

雖然本發明以前述之實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明。在不脫離本發明之精神和範圍內，所為之更動與潤飾，均屬本發明之專利保護範圍。關於本發明所界定之保護範圍請參考所附之申請專利範圍。

#### 【圖式簡單說明】

第 1 圖為  $\text{Cr}^{3+}$  溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖；

第 2 圖為  $\text{VO}^{2+}$  溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖；

第 3 圖為  $\text{Co}^{3+}$  溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖；

第 4 圖為  $\text{Co}^{3+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$  和  $\text{VO}^{2+}$  三種溶液對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖能力影響的比較結果圖；

第 5 圖為  $\text{Cr}^{3+}$  溶液和胰島素一起作用下對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖；

第 6 圖為  $\text{VO}^{2+}$  溶液和胰島素一起作用下對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖；

第 7 圖為  $\text{Co}^{3+}$  溶液和胰島素一起作用下對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖；

第 8 圖為運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖；及

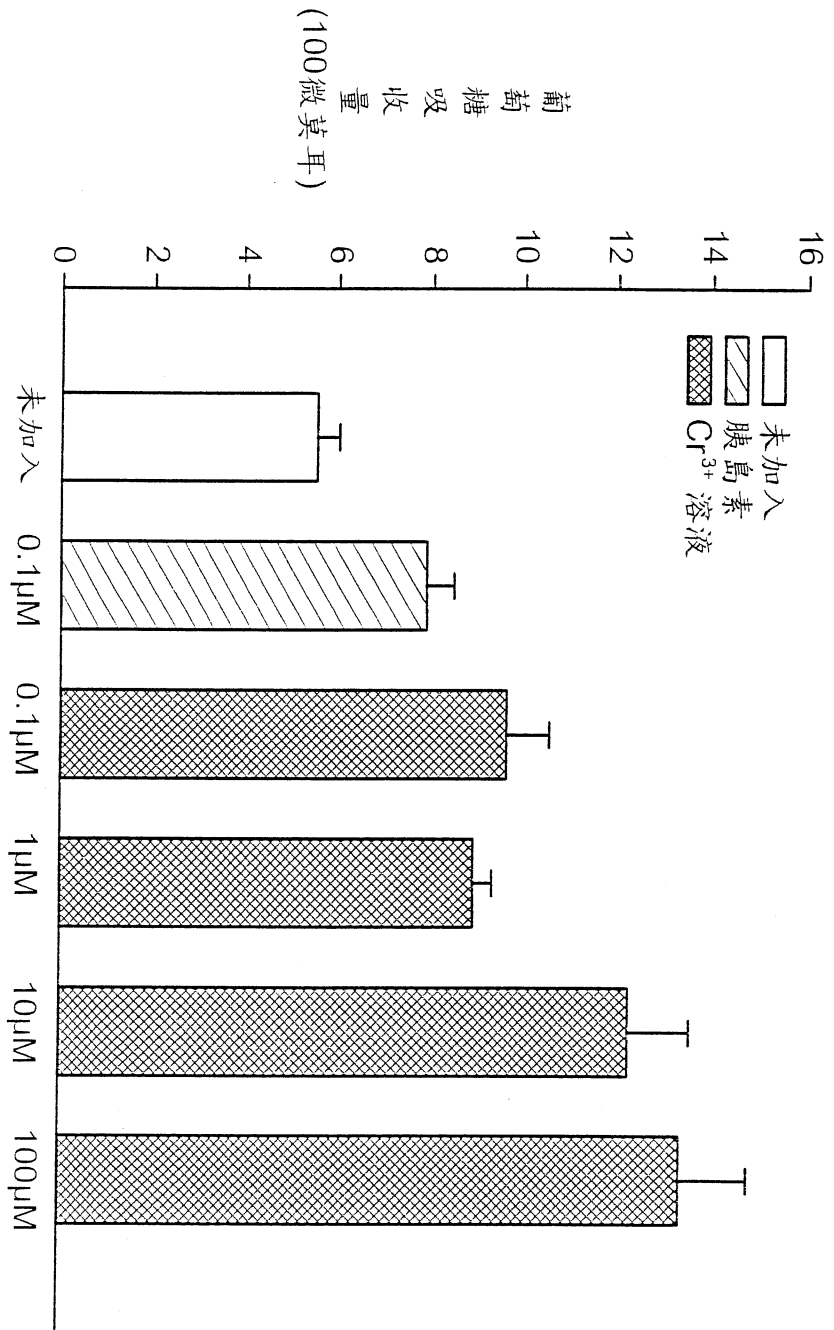
第 9 圖為運鐵蛋白與金屬離子（或氧化金屬離子）之複合物和胰島素一起作用下對  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  細胞吸收葡萄糖的影響結果圖。

【主要元件符號說明】

十、申請專利範圍：

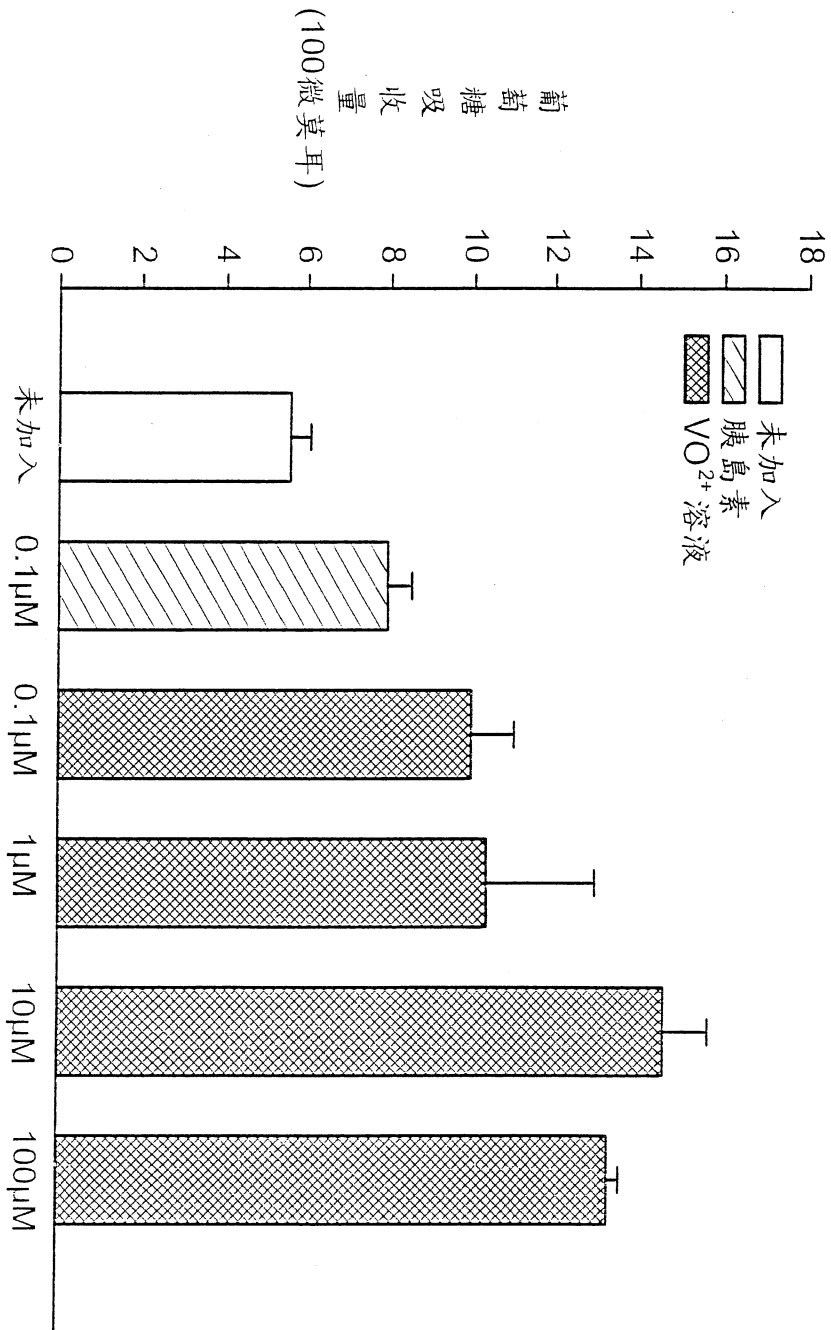
1. 一種供降低糖尿病患者血糖之複合物，該複合物具有一運鐵蛋白與至少一金屬離子，其中該運鐵蛋白運送該金屬離子進入患者之細胞內，用以促使該細胞吸收葡萄糖。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之供降低糖尿病患者血糖之複合物，其中該金屬離子為一二價金屬離子。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之供降低糖尿病患者血糖之複合物，其中該金屬離子為一三價金屬離子。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之供降低糖尿病患者血糖之複合物，其中該三價金屬離子為一三價鉻離子。
5. 如申請專利範圍第 3 項所述之供降低糖尿病患者血糖之複合物，其中該三價金屬離子為一三價鈷離子。
6. 一種供降低糖尿病患者血糖之複合物，該複合物具有一運鐵蛋白與至少一氧化金屬離子，其中該運鐵蛋白運送該氧化金屬離子進入患者之細胞內，用以促使該細胞吸收葡萄糖。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之供降低糖尿病患者血糖之複合物，其中該氧化金屬離子為一二價氧化釩離子。

圖式



第1圖

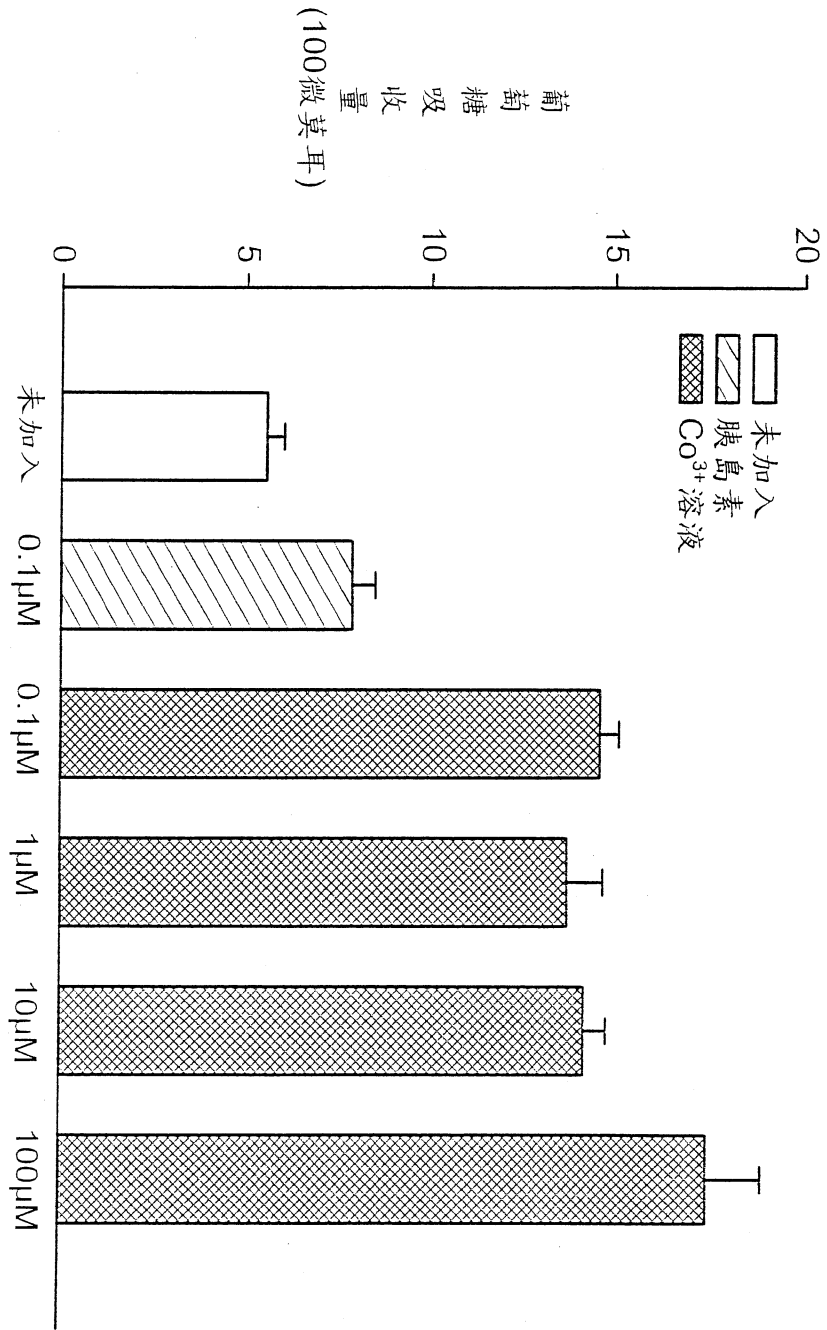
圖式



第2圖

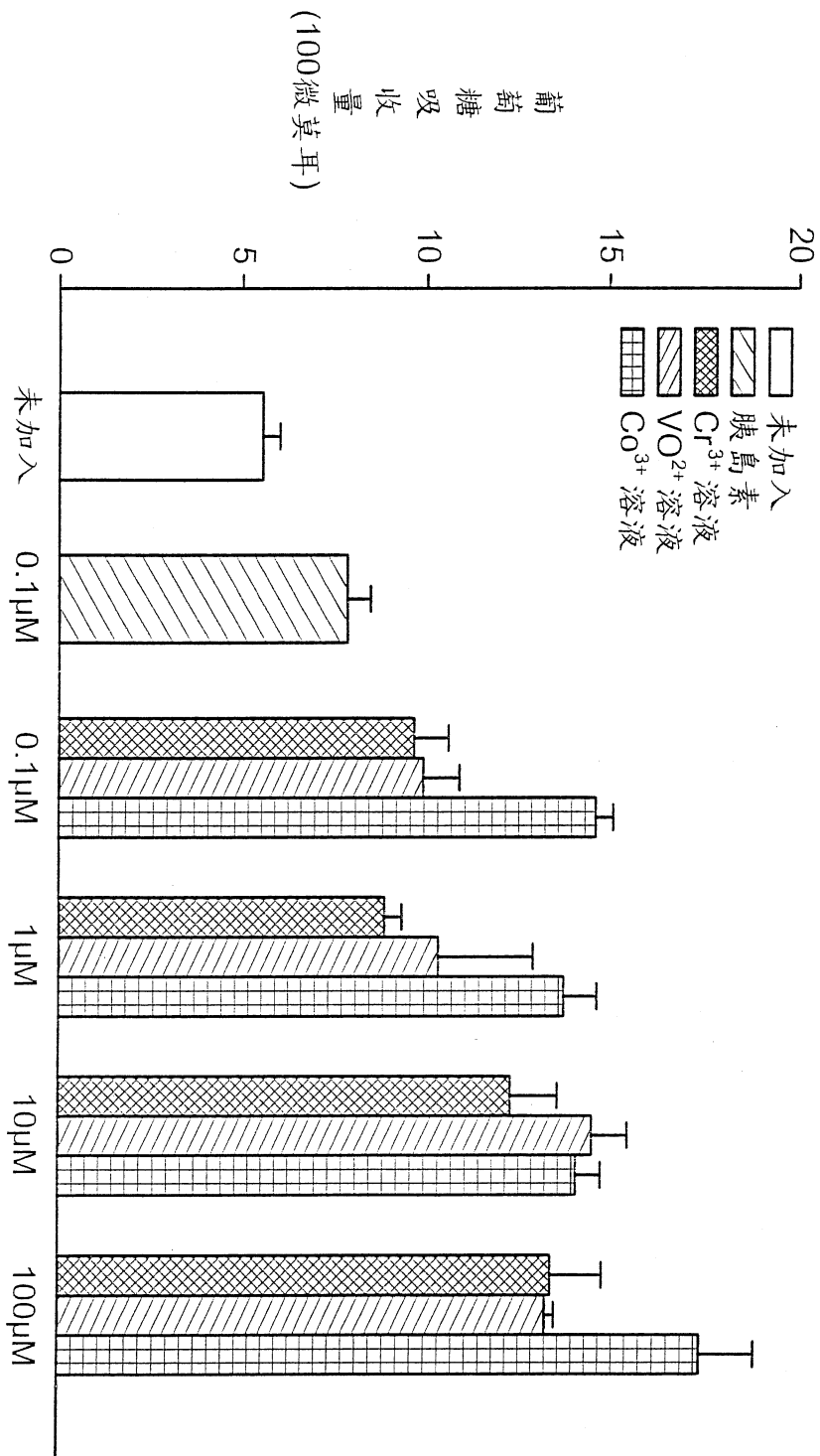


圖式



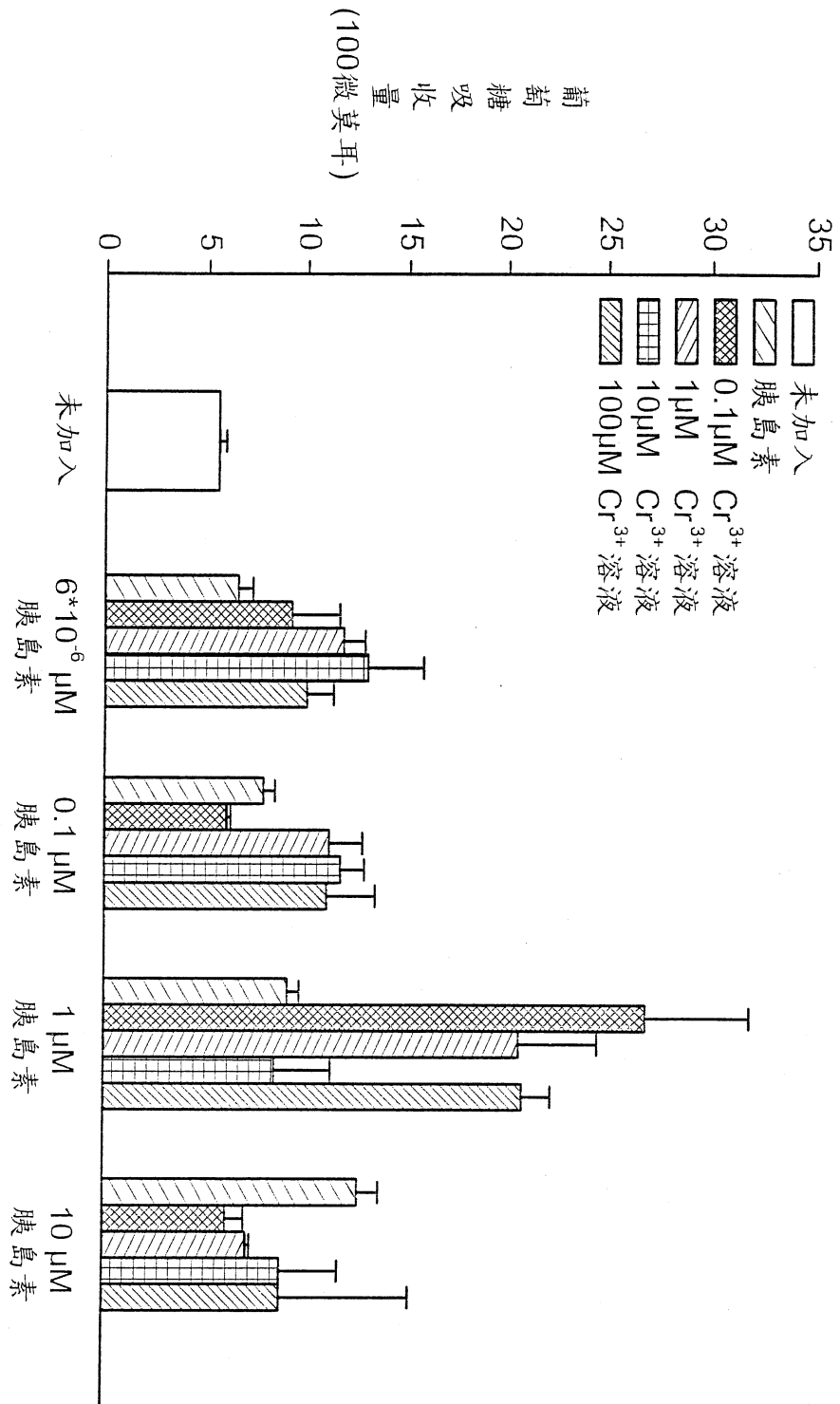
第3圖

圖式

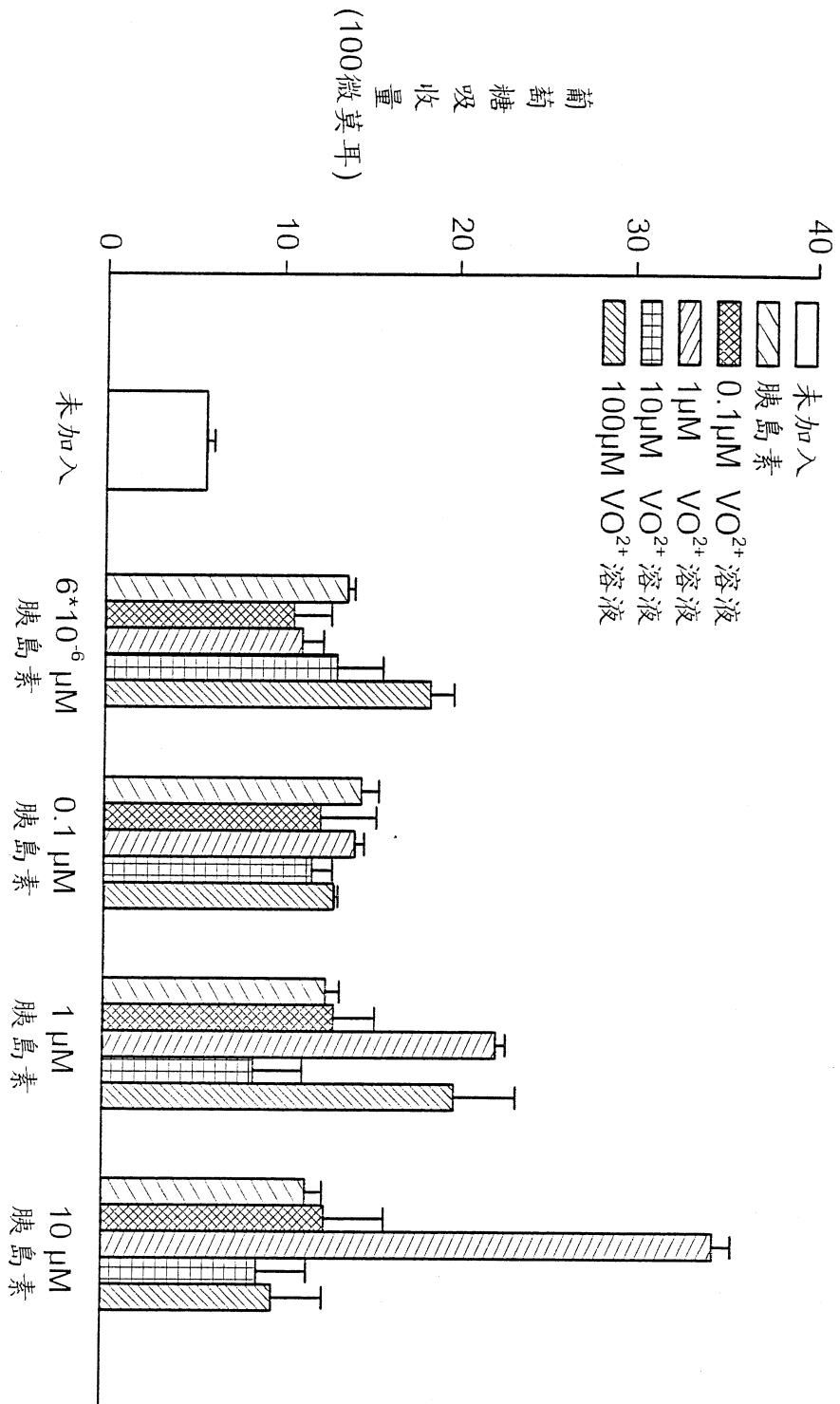


第4圖

圖式

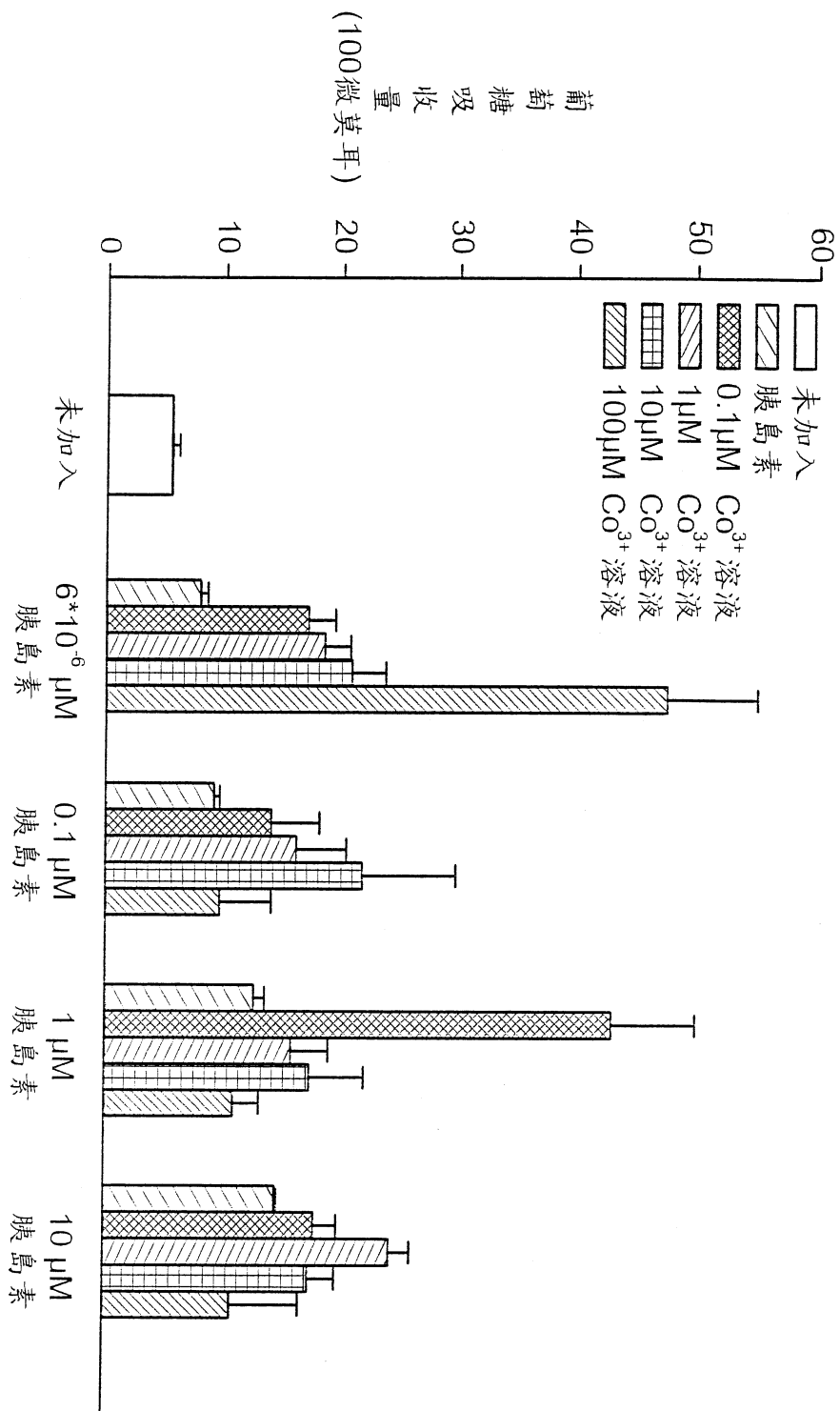


第5圖



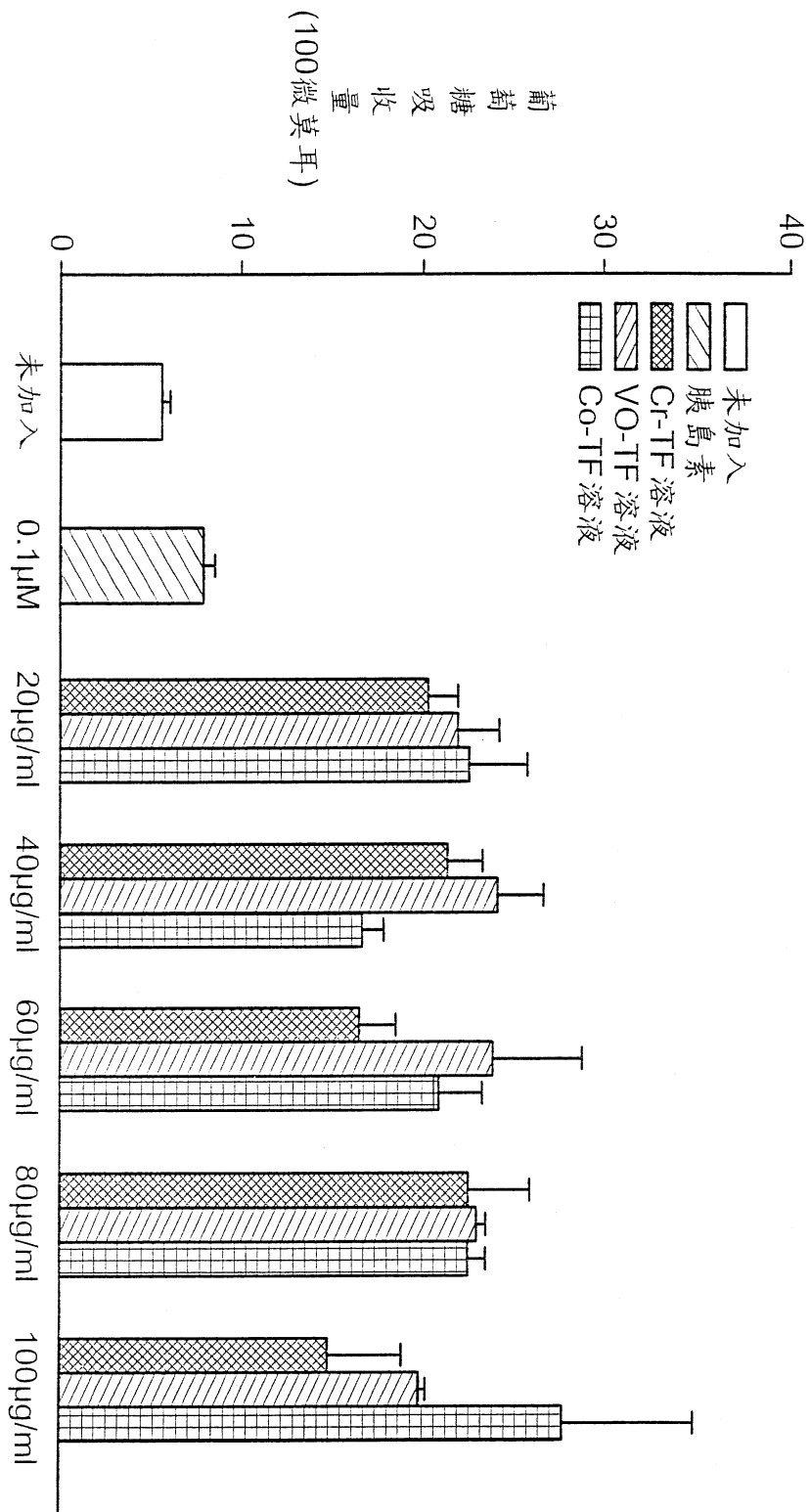
第6圖

圖式



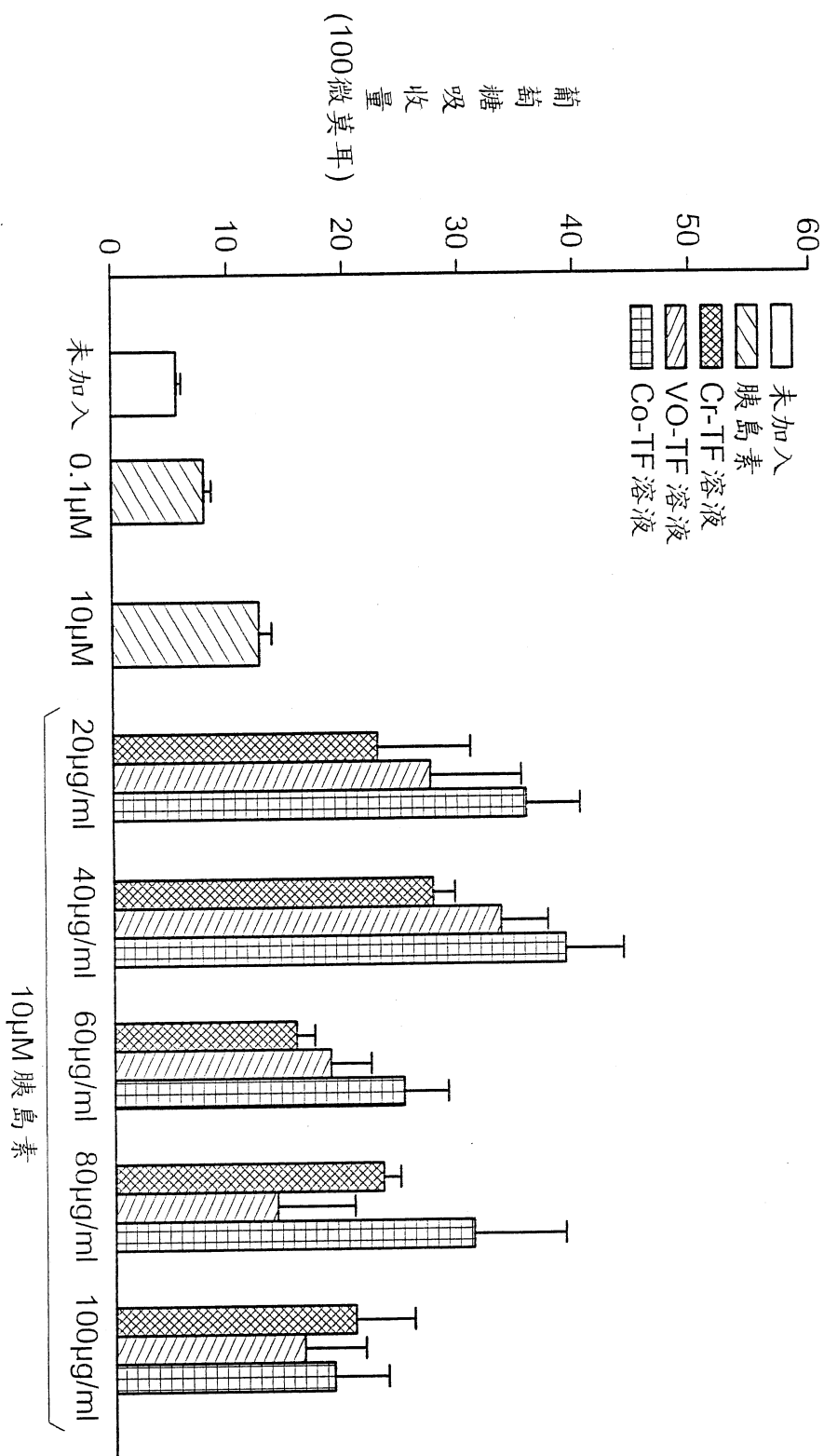
第7圖

圖式



第8圖

圖式



第9圖