(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110812470 A
(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201911091882.6

(22)申请日 2013.07.10

(30)优先权数据
61/670,345 2012.07.11 US

(62)分案原申请数据
201380042721.2 2013.07.10

(71)申请人 佛蒙特大学及州农业学院
地址 美国佛蒙特州

(72)发明人 梅塞德斯·林孔
凯特基·M·哈特莱

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 顾晋伟 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61P 5/00(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

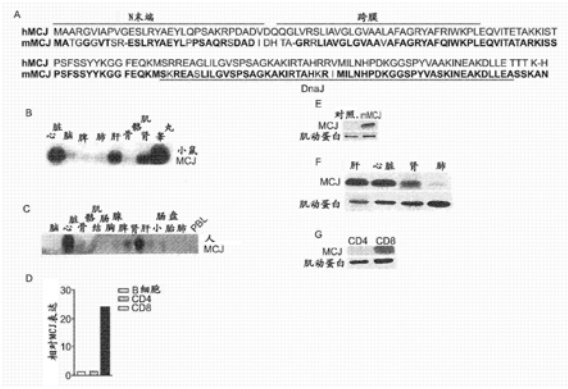
权利要求书4页 说明书35页
序列表6页 附图13页

(54)发明名称

用于代谢调节的方法和组合物

(57)摘要

本发明部分地涉及可用于在体内或体外调节细胞代谢功能的方法和组合物。在一些方面中，本发明包括提高细胞、组织、器官和/或对象中的代谢的方法和/或组合物。在某些方面中，本发明包括可用于降低细胞、组织、器官和/或对象中的代谢的方法和/或组合物。



CN 110812470 A

1.一种用于治疗对象中的代谢疾病或状况的方法,所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效量的MCJ调节化合物以治疗所述对象中的所述代谢疾病或状况。

2.权利要求1所述的方法,其中所述MCJ调节化合物降低所述对象中的MCJ多肽活性并且提高所述对象中的线粒体代谢活性。

3.权利要求2所述的方法,其中降低MCJ多肽活性包括降低MCJ多肽水平或功能。

4.权利要求1所述的方法,其中所述MCJ调节化合物提高所述对象中的MCJ多肽活性并且降低所述对象中的线粒体代谢活性。

5.权利要求4所述的方法,其中提高MCJ多肽活性包括提高MCJ多肽水平或功能。

6.权利要求1所述的方法,其还包括降低所述对象的热量摄取水平。

7.权利要求6所述的方法,其中在向所述对象施用所述MCJ调节化合物之前、同时和/或之后降低热量摄取水平。

8.权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如,肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良;肝疾病,肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病;肾病;心脏病,高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病;中毒;HIV;神经退行性疾病,帕金森病、阿尔茨海默病;癌症,或体育锻炼。

9.权利要求1、4或5中任一项所述的方法,其中所述代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征;胃肠道手术介导的代谢改变、空肠-髂骨旁路术、胃旁路术;以及炎性/感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病以及炎性肠病。

10.权利要求1所述的方法,其中所述对象是禁食对象。

11.权利要求1所述的方法,其中治疗代谢疾病或状况包括增强或抑制细胞毒T细胞活性。

12.权利要求1至11中任一项所述的方法,其中在药物组合物中施用所述MCJ调节化合物。

13.权利要求12所述的方法,其中所述药物组合物还包含可药用载体。

14.权利要求12或13所述的方法,其中所述药物组合物还包含靶向剂。

15.权利要求14所述的方法,其中所述靶向剂是线粒体靶向剂。

16.权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂或小分子MCJ增强剂。

17.权利要求16所述的方法,其中所述MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。

18.权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述对象未患癌症。

19.权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述代谢疾病或状况不是癌症。

20.权利要求1所述的方法,其还包括提高所述对象的热量摄取水平。

21.权利要求20所述的方法,其中在向所述对象施用所述MCJ调节化合物之前、同时和/或之后提高热量摄取水平。

22.一种改变细胞中线粒体代谢的方法,所述方法包括使所述细胞与有效量的外源MCJ调节化合物接触以改变所述细胞中的线粒体代谢,其中提高MCJ多肽活性的MCJ调节化合物

降低所述细胞中的线粒体代谢，而降低MCJ多肽活性的MCJ调节化合物提高所述细胞中的线粒体代谢。

23.权利要求22所述的方法，其中提高MCJ多肽活性包括提高所述细胞中MCJ多肽的水平或功能。

24.权利要求22所述的方法，其中降低MCJ多肽活性包括降低所述细胞中MCJ多肽的水平或功能。

25.权利要求22至24中任一项所述的方法，其中线粒体代谢是线粒体呼吸。

26.权利要求22至25中任一项所述的方法，其中所述细胞在体外。

27.权利要求22至25中任一项所述的方法，其中所述细胞在体内。

28.权利要求27所述的方法，其中所述细胞在对象中，并且所述接触包括向所述对象施用所述MCJ调节化合物。

29.权利要求28所述的方法，其中所述对象是禁食对象。

30.权利要求28所述的方法，其中所述对象是具有提高的热量摄取水平的对象。

31.权利要求28或29所述的方法，其中在药物组合物中施用所述MCJ调节化合物。

32.权利要求31所述的方法，其中所述药物组合物还包含可药用载体。

33.权利要求31或32所述的方法，其中所述药物组合物还包含靶向剂。

34.权利要求33所述的方法，其中所述靶向剂是线粒体靶向剂。

35.权利要求22至34中任一项所述的方法，其中所述MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂或小分子MCJ增强剂。

36.权利要求35所述的方法，其中所述MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。

37.权利要求22至36中任一项所述的方法，其中所述MCJ调节化合物包含线粒体靶向剂。

38.权利要求28至37中任一项所述的方法，其中所述对象患有代谢疾病或状况。

39.权利要求38所述的方法，所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病；肾病；心脏病，高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，帕金森病、阿尔茨海默病；癌症，或体育锻炼。

40.权利要求38所述的方法，其中所述代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变、空肠-髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性/感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。

41.权利要求28至40中任一项所述的方法，其中所述对象未患癌症。

42.权利要求39或40所述的方法，其中所述代谢疾病或状况不是癌症。

43.一种调节对象中的细胞毒T(CD8$^+$T)细胞功能的方法，所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效提高或降低CD8$^+$T细胞中MCJ多肽的活性之量的MCJ调节化合物，其中提高MCJ多肽活性提高CD8$^+$T细胞中线粒体的去极化，而降低MCJ多肽活性降低CD8$^+$T细胞中线粒体的去极化，并且其中线粒体去极化的提高或降低调节所述对象中的细胞毒T细胞功能。

44.权利要求43所述的方法，其中提高MCJ多肽活性包括提高所述细胞中MCJ多肽的水平或功能。

45.权利要求43所述的方法，其中降低MCJ多肽活性包括降低所述细胞中MCJ多肽的水平或功能。

46.权利要求43至45中任一项所述的方法，其中在药物组合物中施用所述MCJ调节化合物。

47.权利要求46所述的方法，其中所述药物组合物还包含可药用载体。

48.权利要求46或47所述的方法，其中所述药物组合物还包含靶向剂。

49.权利要求48所述的方法，其中所述靶向剂是线粒体靶向剂。

50.权利要求43至49中任一项所述的方法，其中所述MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂或小分子MCJ增强剂。

51.权利要求50所述的方法，其中所述MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。

52.权利要求43至51中任一项所述的方法，其中所述对象未患癌症。

53.一种组合物，其包含MCJ调节化合物和可药用载体。

54.权利要求53所述的组合物，其还包含线粒体靶向剂。

55.权利要求53或54所述的组合物，其中所述MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂或小分子MCJ增强剂。

56.权利要求55所述的组合物，其中所述MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。

57.一种确定对象中存在或不存在代谢疾病或状况的方法，所述方法包括：

获得来自对象的生物样品；

测量所述生物样品中MCJ分子的水平；以及

将MCJ分子的测量水平与对照水平进行比较，其中与所述对照水平相比所述生物样品中改变的MCJ分子水平指示了所述对象中存在或不存在代谢疾病或状况。

58.权利要求57所述的方法，其中所述MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。

59.权利要求57或58所述的方法，其中与对照水平相比，所述生物样品中MCJ分子的水平降低。

60.权利要求57或58所述的方法，其中与对照水平相比，所述生物样品中MCJ分子的水平提高。

61.权利要求57所述的方法，其中测量MCJ分子水平包括测量MCJ分子的量和/或功能。

62.权利要求57所述的方法，其还包括至少部分地基于对所述对象中代谢疾病或状况存在或不存在进行确定来为所述对象选择治疗策略。

63.权利要求62所述的方法，其中所述治疗策略包括向所述对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。

64.权利要求62所述的方法，其中所述治疗策略包括停止向所述对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。

65.权利要求60所述的方法，其中所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白

酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病;肾病;心脏病,高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病;中毒;HIV;神经退行性疾病,帕金森病、阿尔茨海默病;癌症,或体育锻炼。

66.权利要求59所述的方法,其中所述代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征;胃肠道手术介导的代谢改变、空肠-髂骨旁路术、胃旁路术;以及炎性/感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。

67.权利要求57至66中任一项所述的方法,其还包括治疗所述对象中确定存在的代谢疾病或状况。

用于代谢调节的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是申请号为201380042721.2的中国专利申请的分案申请,原申请是2013年07月10日提交的PCT国际申请PCT/US2013/049885于2015年02月11日进入中国国家阶段的申请。

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求于2012年7月11日提交的美国临时申请No.61/670345的权益,其内容通过引用整体并入本文。

[0004] 政府利益

[0005] 本发明是在国立卫生研究院授予的R21 CA 127099的政府支持下完成的。政府具有本发明的某些权益。

技术领域

[0006] 本发明部分地涉及可用于调节代谢功能的方法和组合物。

背景技术

[0007] 共伴侣分子(co-chaperone)直接地或通过募集其他蛋白质间接地调节伴侣分子(主要是热休克蛋白(HSP))的活性(Walsh等,2004,EMBO Rep 5,567-571)。虽然已经对伴侣分子的调节和作用进行了广泛研究,但对于大量经鉴定的共伴侣分子的功能依然所知甚少。DnaJ家族共伴侣分子是最大的并且是最多样化的,在人中具有49种经鉴定的成员。其特征为存在高度保守的70个aa的J结构域,所述结构域包含与HSP70家族成员的ATP酶结构域结合并且促进其ATP酶活性的His-Pro-Asp基序(Walsh等,2004,EMBO Rep 5,567-571;Mitra等,2009,Clin Exp Metastasis 26,559-567;Sterrenberg等,2011,Cancer Lett 312,129-142)。根据是否存在J结构域以外的序列以及所述序列的性质,该家族的成员被分为三个亚家族(DnaJA、DnaJB和DnaJC亚家族)(Kampinga等,2009,Cell Stress Chaperones 14,105-111)。DnaJA亚家族包含Gly/Phe(G/F)富含区域和Cys重复区域,而DnaJB亚家族包含G/F区域,但是缺少Cys重复区域。DnaJC亚家族成员高度多样化。其缺少G/F和Cys重复区域二者,而其J结构域可位于蛋白质中的任何位置。但是,大部分DnaJC成员具有较少表征的非经典结构域,这些结构域似乎提供了用于伴侣结合的特异性和功能。

[0008] DnaJ共伴侣分子能够以不依赖于DnaJ结构域的方式与HSP以外的蛋白质相互作用以介导特定功能(Sterrenberg等,2011Cancer Lett 312,129-142)。但是,仅鉴定了少量靶标。在线粒体内,已经表明DNA聚合酶γ(Polga)与Tid1相互作用(Hayashi等,2006Nat Med 12,128-132),最近的研究还鉴定出p53是另一种潜在靶标(Ahn等,2010Oncogene 29,1155-1166)。最近发现DnaJA1与B细胞中的腺苷诱导脱氨酶(Adenosin Induced Deaminase,AID)相互作用并在类别转换重组期间调节其活性(Orthwein等,EMBO J 2011Nov 15;31(3):679-91)。DnaJ共伴侣分子在癌症中的作用在于已经开始研究的这些蛋白质的功能方面,虽然主要是在细胞系中(Mitra等,2009,Clin Exp Metastasis 26,559-567)。另外,在小鼠中仅鉴定出了人DnaJ蛋白质的少量直系同源物(例如,DnaJC10/ERdj5、DnaJB6/Mrj和DnaJA3/

Tid1、DnaJA1/DjA1)(Terada等,2005,EMBO J 24,611-622;Hosoda等,2010,Biochem J 425,117-125;Lo等,2004,Mol Cell Biol 24,2226-2236;Hunter等,1999,Development 126,1247-1258)。

[0009] 缺少已知结构域以及存在很少表征的非经典结构域使得难以对大部分DnaJC家族成员的功能进行表征。因此,尽管在人中鉴定了大量的DnaJ共伴侣分子,但是对于其在正常状况和疾病状况下的功能依然所知不多。

发明内容

[0010] 根据本发明的一个方面,提供了用于治疗对象中的代谢疾病或状况的方法。所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效量的MCJ调节化合物以治疗所述对象中的代谢疾病或状况。在一些实施方案中,MCJ调节化合物降低对象中的MCJ多肽活性并且提高对象中的线粒体代谢活性。在一些实施方案中,降低MCJ多肽活性包括降低MCJ多肽水平或功能。在一些实施方案中,MCJ调节化合物提高对象中的MCJ多肽活性并且降低对象中的线粒体代谢活性。在一些实施方案中,提高MCJ多肽活性包括提高MCJ多肽水平或功能。在某些实施方案中,所述方法还包括降低对象的热量摄取水平。在一些实施方案中,在向对象施用MCJ调节化合物之前、同时和/或之后降低热量摄取水平。在一些实施方案中,代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如,肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症(abeta-lipoproteinemia)、糖原贮积病、韦-克病(Weber-Christian disease)、脂肪营养不良;肝疾病,肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病(Wilson disease);肾病;心脏病,高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病;中毒;HIV;神经退行性疾病,帕金森病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease);癌症,或体育锻炼。在本发明的一些实施方案中,代谢疾病或状况是高胆固醇,并且降低MCJ活性可用在减少细胞、组织或对象中的胆固醇的方法中。在某些实施方案中,代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿(starvation)、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征(re-feeding syndrome);胃肠道手术介导的代谢改变、空肠-髂骨旁路术(jejuno-ilial bypass)、胃旁路术;以及炎性/感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病(juiunal diverticulosis)以及炎性肠病。在一些实施方案中,对象是禁食对象。在一些实施方案中,治疗代谢疾病或状况包括增强或抑制细胞毒T细胞活性。在一些实施方案中,在药物组合物中施用MCJ调节化合物。在某些实施方案中,药物组合物还包含可药用载体。在一些实施方案中,药物组合物还包含靶向剂(targeting agent)。在一些实施方案中,靶向剂是线粒体靶向剂。在一些实施方案中,MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂、或小分子MCJ增强剂。在某些实施方案中,MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。在一些实施方案中,所述对象未患癌症。在一些实施方案中,代谢疾病或状况不是癌症。在某些实施方案中,所述方法还包括提高对象的热量摄取水平。在一些实施方案中,在向对象施用MCJ调节化合物之前、同时和/或之后提高热量摄取水平。

[0011] 根据本发明的另一个方面,提供了改变细胞中线粒体代谢的方法。所述方法包括使细胞与有效量的外源MCJ调节化合物相接触以改变细胞中的线粒体代谢,其中提高MCJ多

肽活性的MCJ调节化合物降低细胞中的线粒体代谢，而降低MCJ多肽活性的MCJ调节化合物提高细胞中的线粒体代谢。在一些实施方案中，提高MCJ多肽活性包括提高细胞中MCJ多肽的水平或功能。在某些实施方案中，降低MCJ多肽活性包括降低细胞中MCJ多肽的水平或功能。在一些实施方案中，线粒体代谢包括线粒体呼吸。在一些实施方案中，细胞在体外。在一些实施方案中，细胞在体内。在某些实施方案中，细胞在对象中，并且所述接触包括向对象施用MCJ调节化合物。在一些实施方案中，所述对象是禁食对象。在一些实施方案中，所述对象是具有提高的热量摄取水平的对象。在某些实施方案中，在药物组合物中施用MCJ调节化合物。在一些实施方案中，药物组合物还包含可药用载体。在一些实施方案中，药物组合物还包含靶向剂。在一些实施方案中，靶向剂是线粒体靶向剂。在某些实施方案中，MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂，或小分子MCJ增强剂。在一些实施方案中，MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。在一些实施方案中，MCJ调节化合物包含线粒体靶向剂。在某些实施方案中，所述对象患有代谢疾病或状况。在一些实施方案中，所述代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良；肝疾病，肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病；肾病；心脏病，高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，帕金森病、阿尔茨海默病；癌症，或体育锻炼。在本发明的一些实施方案中，代谢疾病或状况是高胆固醇，并且降低MCJ活性可用在降低细胞、组织或对象中的胆固醇的方法中。在一些实施方案中，代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变、空肠-髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性/感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。在某些实施方案中，所述对象未患癌症。在一些实施方案中，所述代谢疾病或状况不是癌症。

[0012] 根据本发明的另一个方面，提供了调节对象中的细胞毒T(CD8$^+$T)细胞功能的方法。所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效提高或降低CD8$^+$T细胞中MCJ多肽的活性之量的MCJ调节化合物，其中提高MCJ多肽活性提高了CD8$^+$T细胞中线粒体的去极化，而降低MCJ多肽活性降低了CD8$^+$T细胞中线粒体的去极化，并且其中线粒体去极化的提高或降低调节对象中的细胞毒T细胞功能。在一些实施方案中，提高MCJ多肽活性包括提高细胞中MCJ多肽的水平或功能。在某些实施方案中，降低MCJ多肽活性包括降低细胞中MCJ多肽的水平或功能。在一些实施方案中，在药物组合物中施用MCJ调节化合物。在一些实施方案中，药物组合物还包含可药用载体。在某些实施方案中，药物组合物还包含靶向剂。在一些实施方案中，靶向剂是线粒体靶向剂。在一些实施方案中，MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂，或小分子MCJ增强剂。在一些实施方案中，MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。在某些实施方案中，所述对象未患癌症。

[0013] 根据本发明的另一个方面，提供了包含MCJ调节化合物和可药用载体的组合物。在一些实施方案中，组合物还包含线粒体靶向剂。在一些实施方案中，MCJ调节化合物包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂，或小分子MCJ增强剂。在一些实施方案中，MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。

[0014] 根据本发明的又一个方面，提供了确定对象中存在或不存在代谢疾病或状况的方

法。所述方法包括获得来自对象的生物样品;测量所述生物样品中MCJ分子的水平;以及将MCJ分子的测量水平与对照水平进行比较,其中与对照水平相比生物样品中改变的MCJ分子水平指示着对象中存在或不存在代谢疾病或状况。在一些实施方案中,MCJ分子是MCJ多肽或者编码MCJ多肽的核酸。在某些实施方案中,与对照水平相比,生物样品中MCJ分子的水平降低。在一些实施方案中,与对照水平相比,生物样品中MCJ分子的水平提高。在一些实施方案中,测量MCJ分子水平包括测量MCJ分子的量和/或功能。在一些实施方案中,所述方法还包括,至少部分地基于对所述对象中代谢疾病或状况存在或不存在进行确定来为所述对象选择治疗策略。在某些实施方案中,治疗策略包括向对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。在一些实施方案中,治疗策略包括停止向对象施用用于代谢疾病或状况的药物或者行为治疗。在一些实施方案中,代谢疾病或状况是超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如,肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良;肝疾病,肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝、威尔逊病;肾病;心脏病,高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病;中毒;HIV;神经退行性疾病,帕金森病、阿尔茨海默病;癌症,或体育锻炼。在本发明的一些实施方案中,代谢疾病或状况是高胆固醇。在一些实施方案中,代谢疾病或状况是进食障碍、厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征;胃肠道手术介导的代谢改变、空肠-髂骨旁路术、胃旁路术;以及炎性/感染性状况、细菌过度生长的空肠憩室病或炎性肠病。在某些实施方案中,所述方法还包括治疗对象中确定存在的代谢疾病或状况。

[0015] 本发明并未旨在局限于必须满足本发明所提及的任何目的或特征中的一个或更多个的系统和方法。同样重要的是应注意,本文不限于本发明所述示例性或原始实施方案。本领域普通技术人员进行的修改和替换被认为包含在本发明的范围内。

[0016] 序列简述

[0017] SEQ ID NO:1是GENBANK®登记号AAD38506.1给出的人含DNAJ结构域之蛋白质MCJ的氨基酸序列。

[0018] SEQ ID NO:2是GENBANK®登记号AF126743.1给出的人含DNAJ结构域之蛋白质MCJ的mRNA序列。

[0019] SEQ ID NO:3是小鼠含DNAJ结构域之蛋白质的氨基酸序列。

[0020] SEQ ID NO:4是GENBANK®登记号AAH95400.1给出的人DnaJ(Hsp40)亚家族C同系物的氨基酸序列。

[0021] SEQ ID NO:5是GENBANK®登记号BC095400.1给出的人DnaJ(HSP40)亚家族C同系物的核苷酸序列。

[0022] SEQ ID NO:6来自MCJ内含子1的区域的正向引物。

[0023] SEQ ID NO:7来自MCJ内含子1的区域的反向引物。

[0024] SEQ ID NO:8MCJ的正向引物。

[0025] SEQ ID NO:9MCJ的反向引物。

[0026] SEQ ID NO:10MCJ的探针。

[0027] SEQ ID NO:11:MCJ的正向引物。

[0028] SEQ ID NO:12MCJ的反向引物。

附图说明

[0029] 图1示出了小鼠和人MCJ/DnaJC15的氨基酸序列、印迹图像以及说明特定组织分布的图。图1A示出了人MCJ/DnaJC15的蛋白质序列(上方序列)SEQ ID NO:1及其小鼠中的直系同源物的蛋白质序列(下方序列)SEQ ID NO:3的比对。两个序列的氨基酸的差异以比对比较示出。图1B示出了使用特异性小鼠mcj探针的小鼠正常组织聚A mRNA的Northern印迹分析。图1C示出了使用特异性人mcj探针的人正常组织聚A mRNA的Northern印迹分析。图1D是示出了使用来自小鼠B细胞、CD4 T细胞和CD8 T细胞的RNA通过针对mcj的实时RT-PCR获得的相对MCJ表达的图。mRNA水平相对于β-2微球蛋白归一化。图1E示出了来自用小鼠mcj表达质粒(mMCJ)或空质粒(Cont)转染的293T细胞的全细胞提取物的印迹,其通过Western印迹分析检查小鼠MCJ表达(MCJ)。检查肌动蛋白作为上样对照。图1F示出了表示通过Western印迹分析检查的小鼠肝脏、心脏、肾和肺中内源MCJ蛋白表达的印迹。检查肌动蛋白表达作为上样对照。图1G是表示通过Western印迹分析检查的小鼠CD4 T细胞和CD8 T细胞中内源MCJ蛋白表达的印迹。

[0030] 图2示出了显微照相图像和印迹,其证明内源MCJ定位于线粒体。图2A和B示出了来自野生型小鼠的纯化CD8 T细胞(图2A)和心脏(图2B)中内源MCJ的免疫电子显微镜分析。电子致密金颗粒代表MCJ(箭头指向典型的免疫反应性)。图2A和图2B右侧小图表示左图中更高放大率的插图区域,m＝线粒体;mf＝肌原纤维。20,000×放大率。条形指示200nm比例。图2C示出了MCJ转染的293T细胞中MCJ的免疫电子显微镜分析结果。电子致密金颗粒代表MCJ。条形指示200nm比例。示出了膨胀线粒体(m)。图2还示出了MCJ感染的293T细胞中MCJ(图2D)和mitotracker(图2E)的共聚焦显微术分析,图2F示出了MCJ和mitotracker的重叠。细胞核用TOPRO(蓝色)染色。图2G-I是示出了来自(图2G)小鼠心脏、(图2H)小鼠CD8 T细胞和(图2I)人MCF7细胞的纯化的细胞溶质(Cyt)和线粒体(Mito)提取物中通过Western印迹以及分析检查的MCJ表达的印迹。使用GAPDH作为细胞溶质部分的标记物,CoxIV作为线粒体部分的标志物。

[0031] 图3提供了表明MCJ使线粒体去极化并且降低ATP水平的图。图3A是示出了在培养基中孵育的MCF7细胞和MCF7/siMCJ细胞(10^4细胞)中胞内ATP水平的图。图3B是示出了在培养基或鱼藤酮(Roten)(10μM)中孵育(4小时)后MCF7/siMCJ细胞中胞内ATP水平的图。图3C是示出了用MCJ表达构建体(MCJ)或对照(Cont)转染(16小时)的293T细胞中胞内ATP水平的图。图3D是示出了通过四甲基若丹明、乙酯、高氯酸盐/酯(TMRE)染色并且通过流式细胞术分析测定的用MCJ表达构建体(第一个,示为无阴影)或对照构建体(第二个,示为阴影)转染(16小时)的293T细胞之膜电位的图。图3E是示出了通过TMRE染色以及流式细胞术分析测定的新鲜分离的WT CD8 T细胞(填充的直方图)和WT CD4 T细胞(实线直方图)中MMP的结果的图。图3F是示出了通过MitoSox®-Red染色以及流式细胞术分析测定的新鲜分离的WT CD8 T细胞(填充的直方图)和WT CD4 T细胞(实线直方图)中mROS的结果的图。图3G是示出了如图3E中测定的新鲜分离的WT CD8 T细胞(填充的直方图)和MCJ KO CD8 T细胞(实线直方图)中MMP的结果的图。图3H是示出了如图3F中测定的新鲜分离的WT CD8 T细胞(填充的直

方图)和MCJ KO CD8 T细胞(实线直方图)中mROS的结果的图。图3I是示出了新鲜分离的WT CD4 T细胞(填充的直方图)和MCJ KO CD4 T细胞(实线直方图)中MMP的结果的图。图3J是示出了新鲜分离的WT CD4 T细胞(填充的直方图)和MCJKO CD4 T细胞(实线直方图)中如上所述测定的mROS的结果的图。数据代表了三个独立实验。

[0032] 图4提供了示出Southern印迹分析的结果(图4A)的印迹图,示出了野生型(+/+)、杂合体(+/-)和MCJ KO(-/-)小鼠中MCJ靶向(～11Kb)和野生型(～16Kb)等位基因。图4B示出了来自野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠的肝脏、心脏、CD4和CD8 T细胞的全细胞提取物中来自针对MCJ的Western印迹分析的印迹。分析肌动蛋白作为上样对照。图4C示出了使用分离自WT、MCJ KO和MCJ杂合小鼠的CD8 T细胞的RNA通过针对MCT使用的RT-PCR获得的印迹。检测了次黄嘌呤转磷酸核糖基酶(HPRT)表达作为对照。

[0033] 图5在图5A中示出了通过流式细胞术分析证明来自野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠的淋巴结中CD4和CD8 T细胞的分布的图。数值标识了每个象限群中细胞的相对百分比。图5B是示出用抗CD3和抗CD28 Ab活化(3天)后的野生型(WT)(粗线)和MCJ敲除(KO)(细线)CD8 T细胞的生存力的图,在流式细胞术分析中使用UV-Blue染色。

[0034] 图6提供了证明在休眠的效应CD8 T细胞中MCJ的损失维持了高的线粒体代谢的图。图6A是示出了通过^{3}H-胸苷掺入测定的响应于抗CD3和抗CD28 Ab的来自野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠的纯化CD8T细胞的增殖的图。图6B示出了通过TMRE染色确定的在用抗CD3和抗CD28 Ab活化1天(左)或2天(右)后WT CD 8T细胞(细线)、MCJ KO CD8 T细胞(实线)和WT CD4 T细胞(填充高的直方图)中MMP的图。图6C和6D是示出了来自用抗CD3和抗CD28 Ab活化2天、洗涤并且在培养基中单独孵育0小时(左图)、24小时(中图)或48小时(右图)的WT CD8 T(填充的直方图)和MCJ KO CD8 T细胞(实线)的结果的图形。如图3中所述检查MMP(图6C)和mROS(图6D)。图6E是示出了用抗CD3和抗CD28 Ab活化(2天)、洗涤、计数并且在培养基中孵育12小时的野生型(WT)和MCJ敲除(KO)CD8 T细胞的图。测定了10^{4}个细胞中的胞内ATP水平。图6F是示出了活化2天、洗涤并且将相等数目的细胞在培养基中单独孵育0、24或48小时的野生型(WT)和MCJ敲除(KO)CD8 T细胞的结果的图。通过在培养基中不同时间段得到的活细胞数相对于第2天布板的细胞数来测定细胞存活率。图6G是用抗CD3和抗CD28抗体活化2天、在IL-2(25U/ml)的存在下扩增额外2天的来自Thy1.1^{+}OT-1(WT)和MCJ KOThy1.1/1.2^{+}OT-I(KO)小鼠的CD8 T细胞的结果的图。将相等数目的细胞混合并转移到Thy1.2^{+}野生型小鼠中。15天后,收获淋巴结(LN)和脾并且通过流式细胞术测定供体细胞的频率。示出了相应供体细胞之间大细胞的百分比。符号表示单个小鼠。*表示$p<0.05$。通过student t检验确定WT和KO淋巴结(LN)之间或WT和KO脾之间的统计学显著性。这里给出的数据代表了至少2个或3个独立实验。

[0035] 图7提供了示出通过MitoSox®Red染色确定的用抗CD3和抗CD28Ab活化1天(左)或2天(右)后野生型(WT)CD8 T细胞(细线)、MCJ敲除(KO)CD8 T细胞(实线)和WT CD4 T细胞(填充的直方图)中mROS结果的图。

[0036] 图8提供了证明禁食期间MCJ缺陷增强肝脂质代谢的显微照相图像和图。图8A示出了通过H&E染色的来自正常或禁食(36小时)条件下野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠的肝组织形态图。条形指示200μm(正常条件,100×放大率)、100μm(正常条件,200×放大率)、100μm(禁食条件,100×放大率)和50μm(禁食条件,200×放大率)。图8B示出了用用于检测脂质

的Oil Red O染色禁食(36h)的野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠的冷冻肝脏的显微切片。深色内容物指示脂质,与KO样品相比,在WO中看到了更高的水平。图8C和8D是示出了禁食的WT和MCJ KO小鼠(n=4)中血清甘油三酯水平(图8C)和FFA(图8D)的图。*表示p<0.05。通过Student t检验确定统计学显著性。。

[0037] 图9示出了正常喂食的野生型和MCJ敲除(KO)小鼠中褐色脂肪的摄像图像和显微照相图像。图9A示出了正常喂食条件下野生型和MCJKO小鼠中褐色脂肪(箭头)的图,图9B示出了正常喂食条件下野生型和MCJ KO小鼠中褐色脂肪的组织形态。条形指示100μm比例。

[0038] 图10示出了禁食36小时的野生型和MCJ敲除(KO)小鼠中褐色脂肪的摄像图像和显微照相图像。图10A示出了野生型和MCJ KO小鼠中褐色脂肪(箭头)的图,图10B示出了野生型和MCJ KO小鼠中褐色脂肪的组织形态。条形指示100μm比例。

[0039] 图11示出了表明MCJ缺陷在禁食期间促进糖原生成的图和显微照相截图。图11A示出了野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠(n=3)中禁食36小时后总体重减轻相对于初始体重的百分比。图11b示出了禁食前WT和MCJ KO小鼠的总体重。图11C示出了禁食后12小时WT和MCJ KO小鼠血液中葡萄糖水平的比较。图11D示出了禁食前和禁食期间WT和MCJ KO血液中葡萄糖水平的比较。图11E示出了禁食(36小时)后来自WT和MCJ KO小鼠的肝脏提取物中ATP浓度的比较。图11F示出了禁食后来自WT和MCJ KO小鼠的肝脏切片中的PAS染色。图11G示出了禁食(36h)或正常喂食后来自WT和MCJ KO小鼠(n=3)的肝脏提取物中糖原浓度的比较。图11H示出了禁食(36h)或正常喂食后WT和MCJ KO小鼠的肝脏重量相对于总体重的百分比。图11I示出了来自正常喂食(Cont)或禁食(Fast)36小时后的WT和MCJ KO小鼠的肝脏中糖原合成酶(GS)和PEPCK的Western印迹分析。示出了禁食状态下来自两种小鼠的肝脏。图11J示出了在4周的高胆固醇饮食之后WT和MCJ KO小鼠(n=5)的肝脏中的胆固醇含量。图11K是示出了用正常饮食喂养的WT和MCJ KO小鼠(n=4)的肝脏中胆固醇含量。*,P<0.05。通过Student t检验确定统计学显著性。误差线表示标准差。

[0040] 图12提供了证明在MCJ缺陷小鼠中延缓乳腺肿瘤生长的印迹、显微照相图像和图。图12A是示出了使用全细胞提取物通过Western印迹分析所检查的来自野生型(WT)雌性小鼠的正常乳腺(N)中或者分离自两只MMTV-PyMT小鼠(T1和T2)的乳腺肿瘤中MCJ表达的印迹。图12B是示出了使用来自MMTV-PyMT肿瘤的全细胞提取物(WE)、细胞溶质提取物(Cyt)和线粒体提取物(Mito)通过Western印迹分析所检查的MCJ表达结果的印迹。还检查了CoxIV和GAPDH。图12C是示出了使用全细胞提取物通过Western印迹分析所检查的来自正常乳腺组织(N)或来自MMTV-PyMT肿瘤(T)的线粒体提取物中MCJ表达结果的印迹。图12D是MMTV-PyMT野生型(WT)和MCJ KO MMTV-PyMT[MCJ敲除(KO)]小鼠(n=8)的Kaplan-Meier存活曲线。通过logrank检验确定统计学显著性。图12E提供了显微照相图像,其示出了来自MMTV-PyMT和MCJ KO MMTVPyMT小鼠的乳腺肿瘤的组织形态(H&E)。图12F是示出了来自MMTV-PyMT野生型(WT)小鼠(n=5)和MCJ MMTVPyMT敲除(KO)小鼠(n=6)的肿瘤的线粒体提取物中ATP水平相对于细胞溶质提取物中ATP水平的比例的图。*表示p<0.05。通过student t检验确定统计学显著性。

[0041] 图13提供了证明MCJ是线粒体呼吸链复合体I活性的阻遏物的印迹和结果图。图13A是示出了通过Western印迹分析检查的来自由WT和MCJ KO心脏产生的线粒体提取物的复合体I免疫沉淀物中的MCJ、NDUFA9和NDUFS3存在的印迹。图13B是示出了来自野生型(WT)

和MCJ敲除(KO)小鼠心脏的线粒体提取物中的相对复合体I活性的图。图13C是示出了通过Western印迹分析检查的来自野生型(WT)和MCJ敲除(KO)小鼠的心脏线粒体提取物中NDUFA9和MCJ表达的印迹。图13D是示出了来自新鲜分离的野生型(WT)CD4、野生型(WT)CD8和MCJ敲除(KO)CD8 T细胞的线粒体提取物(5μg)中相对复合体I活性的图。图13E是示出了通过Western印迹分析检查的来自野生型(WT)CD4、野生型(WT)CD8和MCJ敲除(KO)CD8 T细胞的线粒体提取物中MCJ、NDUFA9、NDUFS3和肌动蛋白表达的印迹。图13F是通过Western印迹分析检验的印迹,其示出了来自MCF7细胞和MCF7/siMCJ细胞(siMCJ)的线粒体提取物中NDUFA9和MCJ的表达。图13G是纯化自MCF7细胞和MCF7/siMCJ细胞的线粒体提取物中相对复合体I活性的图。

具体实施方式

[0042] 现已发现调节MCJ多肽活性的方法和化合物可用于治疗以代谢调节异常为特征之疾病和状况。MCJ/DnaJC15充当了独特的线粒体共伴侣分子,其负调节线粒体呼吸链复合体I和ATP产生。并且已经确定了这种负反馈响应于选择性代谢压力而减弱线粒体呼吸。因此,MCJ缺陷阻碍响应于禁食的代谢慢化,并且MCJ缺陷增强了线粒体脂质氧化,这导致肝脏中脂质积累降低并且防止脂肪变性。MCJ缺陷引起的提高的线粒体呼吸还表现出延缓乳腺肿瘤生长。

[0043] DnaJ家族共分子伴侣是最大的,在人中具有超过49种经鉴定成员。虽然DnaJ结构域在进化中高度保守,但是该家族的成员在非保守结构域、其组织表达及细胞定位方面不同。大部分脊椎动物DnaJ成员在初生组织中的功能依然有待阐明。在本研究中,现在首次描述了人MCJ的小鼠直系同源物(DnaJC15)及其在两种物种之间保守的特定组织分布。现已证明,MCJ通过干扰复合体I活性来为线粒体呼吸链和ATP产生提供负反馈。更重要的是,本结果表明MCJ是体内代谢切换的关键调节物,这是之前对于任何其他DnaJ家族成员未曾报道的新功能。细胞定位影响DnaJ家族成员的特定功能。在多种原代(primary)组织和细胞中使用免疫-EM和生物化学分析,现已表明MCJ定位于线粒体,接近内膜。

[0044] 甲基化控制的J蛋白(MCJ)/DnaJC15是共伴侣分子DnaJC亚家族的成员。MCJ是具有150个氨基酸的小蛋白质,是DnaJC家族的独特成员。与常见的N末端位置相反,其包含位于C末端的J结构域,并且其N末端区域与任何其他已知蛋白质都没有同源性。另外,MCJ还包含跨膜结构域,而大部分DnaJ蛋白是可溶的。系统发生研究已表明,MCJ仅存在于脊椎动物中,在脊椎动物中其高度保守(Hatle等,2007)。GENBANK®登记号AAD38506.1的人含DNAJ结构域之蛋白质MCJ的氨基酸序列在本文中以SEQ ID NO:1给出。SEQ ID NO:2是GENBANK®登记号AF 126743.1给出的人含DNAJ结构域之蛋白质MCJ的mRNA序列。

[0045] GENBANK®登记号AAH95400.1提供了C亚家族的人DnaJ(Hsp40)同系物的氨基酸序列,其在本文中以SEQ ID NO:4提供。SEQ ID NO:5是GENBANK®登记号BC095400.1给出的C亚家族的人DnaJ(HSP40)同系物的核苷酸序列。

[0046] MCJ/DnaJC15是第一种示出在人和小鼠二者中均停留在线粒体中的DnaJ跨膜成员。另外,现已表明MCJ的功能之一是为复合体I提供负反馈以便在需要时降低其活性。因此,在不存在MCJ的情况下,复合体I的活性显著提高。已经鉴定了完全激活复合体I所必需

的若干相关蛋白质(McKenzie和Ryan,2010IUBMB Life 62,497-502),MCJ是抑制其活性的少数分子之一。有趣的是,复合体I在进化过程中的显著变化是在脊椎动物中获得失活和活性两种形式,但在原核生物中仅鉴定到活性形式(Clason等,2009J Struct Biol 169,81-88;Ohnishi等,1998Biochim Biophys Acta 1365,301-308)。因此,哺乳动物复合体I是活性形式和失活形式二者的混合物。调节这两种形式之间平衡的机制依然不清楚。由于MCJ来源于脊椎动物并且抑制复合体I活性,所以假设MCJ调节复合体I活性形式和失活形式之间的平衡。

[0047] 在其他发现之中,现已表明:(1)MCJ/DnaJC15是线粒体复合体I的新的内源负调节物;(2)MCJ缺陷导致线粒体呼吸和ATP的产生增强;(3)MCJ缺陷加速肝中脂质代谢,并且防止了脂肪变性的发生;以及(4)MCJ对线粒体氧化磷酸化的负调控影响癌症进展。

[0048] 本发明部分涉及调节MCJ/DnaJC15(本文也称为MCJ多肽)的活性(例如,水平和/或功能),以调节细胞、组织、器官和对象中的代谢活性。本发明的组合物、化合物和方法可用于治疗患有或有风险患上可能以异常的MCJ活性水平或不期望的MCJ多肽活性水平为特征的代谢疾病或状况的对象。本发明还部分涉及诊断和评估可能以异常的MCJ多肽活性为特征的代谢疾病和状况之状态的方法。因此,本发明的方法和化合物可用于治疗和评估对象中这样的代谢疾病和状况。本发明还部分涉及将对象中的MCJ多肽活性从初始活性水平调节到有效降低或消除代谢疾病或状况的症状和/或防止代谢疾病或状况的症状出现的活性水平。

[0049] 如本文使用的,对象应意指人或脊椎哺乳动物,包括但不限于狗、猫、马、山羊和灵长类动物(如猴)。因此,本发明可用于治疗人和非人对象中的疾病或状况。例如,本发明的方法和组合物可用在兽医应用中以及人的预防和治疗方案中。在本发明的一些实施方案中,对象是人。在本发明的一些实施方案中,对象未患癌症。在本发明的某些实施方案中,对象患有癌症。在某些实施方案中,对象经历热量减少,例如禁食。如本文使用的,术语“禁食”意指降低的热量摄取,其可以包括在预定时间段使给定对象的正常的热量摄取降低达5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在本发明的一些实施方案中,预定时间段可以是1、2、3、4、5、6、7天或更多天;1、2、3、4周或更多周;1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或更多个月;和/或1、2、3、4、5年或更多年。本领域技术人员能够使用本领域中已知的标准和推荐(例如,身高/体重表等)来评估给定对象的正常热量摄取水平和降低的热量摄取水平。如本文使用的,禁食可以被认为是用于以异常的MCJ多肽活性为特征的代谢疾病或状况的行为治疗。

[0050] 可以应用本发明之对象的非限制性实例是被诊断患有、怀疑患有或有风险患上代谢疾病或状况的对象。本发明的方法可以应用于在治疗之时已经被诊断患有代谢疾病或状况的对象或者被认为有风险患上患上或出现代谢疾病或状况的对象。

[0051] 在本发明的一些方面,患有代谢疾病或状况的对象是与正常对照相比具有可检测的代谢异常的对象。在本发明的某些方面,对象与正常对照相比可能不具有显著差异,但是希望使用本文提供的方法改变对象的代谢活性。例如,与未患糖尿病或脂肪肝疾病的正常对照相比,对象可具有与对象的代谢活性异常相关联的代谢疾病,例如糖尿病或脂肪肝疾病。在另一个实例中,对象可患有希望提高对象之代谢的代谢状况,例如增加的锻炼。

[0052] 在本发明的一些方面,对象有风险患上或发生代谢疾病或状况。有风险发生代谢

疾病或状况的对象是与发生代谢疾病或状况的对照风险相比发生疾病或状况的可能性提高的对象。在本发明的一些实施方案中，风险水平可能是与对照风险水平相比统计学上显著的。有风险的对象可以包括：例如，具有遗传异常的对象，所述遗传异常的存在已经被证明与更高的发生代谢疾病或状况的可能性相关；具有代谢疾病或状况的家族和/或个人病史的对象；暴露于试剂(如化学毒素)或活性(activity)的对象；和/或之前已经对代谢疾病或状况进行过治疗并且表观上缓解的对象。

[0053] 在一些代谢疾病或状况中，细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性相对于未患代谢疾病或状况的细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性来说可能更高。因此，在一些可以利用本发明的方法和化合物治疗的疾病和状况中，比正常高的MCJ多肽活性可以是代谢疾病或状况的特征，也可用于诊断代谢疾病或状况。某些代谢疾病或状况的特征可能不是细胞、组织或对象中比正常高的MCJ活性水平，但是可以通过降低给定对象中的MCJ多肽活性来治疗。例如，与来自未患代谢疾病或状况的样品、组织或对象的对照水平相比，对象可能具有正常的MCJ多肽活性水平，但是降低对象中的水平可能治疗该对象中的代谢疾病或状况。

[0054] 因此，本发明的一些实施方案包括以有效降低细胞、组织或对象中MCJ多肽活性的量来向细胞、组织或对象施用化合物作为对疾病或状况的治疗的方法。可以通过降低细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性治疗以下代谢疾病和状况，例如：超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良；肝疾病，包括但不限于：肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝和威尔逊病；肾病；心脏病，包括但不限于：高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，包括但不限于：帕金森病、阿尔茨海默病；体育锻炼；和癌症。

[0055] 在一些代谢疾病或状况中，细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性相对于未患所述代谢疾病或状况的细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性来说可能更低。因此，在一些可利用本发明发方法和化合物治疗的疾病或和状况中，比正常低的MCJ多肽活性可以是所述代谢疾病或状况的特征，也可用于诊断所述代谢疾病或状况。某些代谢疾病或状况的特征可能不是细胞、组织或对象中比正常低的MCJ活性水平，但是可以通过提高给定对象中的MCJ多肽活性来治疗。例如，与来自未患代谢疾病或状况的样品、组织或对象的对照水平相比，对象可能具有正常的MCJ多肽活性水平，但是提高对象中的水平可能治疗所述对象中的代谢疾病或状况。

[0056] 因此，本发明的一些实施方案包括以有效提高细胞、组织或对象中MCJ多肽活性的量来向细胞、组织或对象施用化合物作为对疾病或状况的治疗的方法。可以通过提高细胞、组织或对象中的MCJ多肽活性治疗以下代谢疾病和状况，例如：进食障碍，包括但不限于厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变，包括但不限于空肠-髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性/感染性状况，包括但不限于细菌过度生长的空肠憩室病和炎性肠病。

[0057] 可以根据本发明测定MCJ多肽活性(例如，MCJ多肽的水平和/或MCJ多肽的功能)并且与MCJ多肽活性的对照值相比较。对照可以是预定值，所述预定值可以是多种形式。其可以是单截止值，例如中位数或平均值。其可以基于比较组来确定，例如具有正常的MCJ多肽

活性量的组以及具有异常的MCJ多肽活性量的组。比较组的另一个实例可以是具有代谢疾病或状况的一种或更多种症状或诊断的组，以及不具有代谢疾病或状况的一种或更多种症状或诊断的组。另一种比较组可以是具有代谢疾病或状况的家族病史的组，以及不具有这种家族病史的组。可以如下设置预定值，例如，在将测试群体等分(或不等分)成多个组(如低风险组、中度风险组和高风险组)或者四分位数或五分位数时，最低四分位数或五分位数是具有最低风险(例如代谢疾病或状况的风险)和最低的MCJ多肽活性量的个体，最高象限或五分相位是具有最高风险(例如代谢疾病或状况的风险)和最高的MCJ多肽活性量的个体。

[0058] 当然，预定值将取决于所选择的特定群体。例如，与已知患有异常MCJ蛋白表达或存在相关的状况的群体相比，表观健康的群体将具有不同的“正常”范围。因此，选择的预定值可考虑个体或细胞所落入的类别。本领域普通技术人员仅通过常规实验就能选择合适的范围和类别。如本文使用过的，“异常”意指与正常对照相比显著不同。异常高的MCJ多肽活性意指相对于所选择对照高，并且可以包括与正常对照水平相比对象或细胞中的活性升高至少0.1％、0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、150％、200％或更多。异常低的MCJ多肽活性意指相对于所选正常对照低，并且可以包括与正常对照水平相比对象或细胞中降低至少0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％。通常，对照是基于合适年龄段的表观健康的正常个体，或者表观健康的细胞。

[0059] 在本发明的一些方面，所确定的对象的MCJ多肽活性值可用作随后确定同一对象中的MCJ多肽活性的对照值，从而使得能够评估与对象中“基线”MCJ多肽活性的偏离。因此，可以确定对象中的初始MCJ多肽活性水平，并且利用本发明的方法和化合物来降低对象中的MCJ多肽活性水平，以初始水平作为所述对象的对照水平。使用本发明的方法和化合物，随着对象中代谢疾病或状况的治疗，对象中的MCJ多肽活性相对于初始水平可降低至少0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或更多。相似地，可以确定对象中的初始MCJ多肽活性水平，并且利用本发明的方法和化合物来提高对象中的MCJ多肽活性水平，以初始水平作为所述对象的对照水平。使用本发明的方法和化合物，随着对象中代谢疾病或状况的治疗，对象中的MCJ多肽活性相对于初始水平可提高至少0.5％、1％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％或更多。

[0060] 应理解，除了预定值外，根据本发明的对照可以是与实验材料平行测试的材料样品。实例包括来自待与实验样品平行测试的通过制备产生的对照群体或对照样品的样品。

[0061] 现在已经确定，细胞线粒体MCJ多肽活性水平与是否存在代谢疾病或状况相关，提高的MCJ多肽活性量相当于提高了对象中代谢疾病或状况的风险。与对象细胞具有较高的MCJ多肽活性水平时的预后相比，对象中细胞线粒体中较低的MCJ多肽活性水平现在也已经与对象更积极的预后相关。例如但是并不意在限于，较低的MCJ多肽活性水平提高了肝脏中的脂质代谢速率，并且避免了脂肪变性的发生，这导致与较高的MCJ多肽活性水平相比对象中更好的预后。因此，细胞中较高的MCJ表达和功能水平与对象中更高可能发生代谢疾病和异常以及更坏的预后相关。本领域普通技术人员将意识到，术语较高、较低、降低、升高可表示与对照水平或值相比的相对水平或值。

[0062] 尽管未旨在受任何特定理论的束缚，认为MCJ停留在线粒体中，在那里其充当了线

粒体呼吸链的复合体I的负调节物。MCJ的损失导致复合体I活性升高、线粒体超极化以及ATP的产生增加。在不存在MCJ的情况下，增强的线粒体氧化磷酸化作为能量来源在饥饿期间加速了脂肪酸氧化，避免了脂质在肝脏中的积累。另外，还已发现MCJ缺陷延缓乳腺肿瘤的生长，这与无法减弱线粒体功能相关。

[0063] 另外，尽管未旨在受任何特定理论的束缚，认为调节MCJ多肽活性还与调节细胞、组织和对象中的细胞毒T(CD8$^+$T)细胞功能相关。在一些实施方案中，本发明的方法可包括向需要这种治疗的对象施用有效提高或降低CD8$^+$T细胞中MCJ多肽活性之量的MCJ调节化合物。已经发现提高MCJ多肽活性提高CD8$^+$T细胞中线粒体的去极化，而已经发现降低MCJ多肽活性降低CD8$^+$T细胞中线粒体的去极化。因此，施用调节MCJ多肽活性的化合物可用于提高或降低线粒体的去极化，从而调节对象中细胞毒T细胞的功能。

[0064] 治疗

[0065] 本发明在一些方面中涉及用于调节细胞、组织和/或对象中MCJ多肽活性的方法。本文使用的术语“调节”意指改变细胞中MCJ多肽活性的水平(例如，MCJ多肽水平和/或功能)。在本发明的一些实施方案中，改变MCJ多肽活性包括改变细胞或组织中MCJ多肽的水平。因此，提高细胞中MCJ多肽的活性可包括提高细胞中MCJ多肽的水平(例如，量)。相似地，降低细胞中MCJ多肽的活性可包括降低细胞中MCJ多肽的水平(例如，量)。在本发明的一些实施方案中，可以通过提高MCJ多肽的表达来改变或调节MCJ多肽的水平。因此，本发明方法的一些实施方案可包括提高或降低细胞、组织或对象中MCJ多肽编码核酸的水平，这可导致细胞、组织或对象中MCJ多肽活性的提高。本发明方法的某些实施方案可包括通过例如向细胞、组织或对象中递送MCJ多肽直接提高或降低细胞、组织或对象中MCJ多肽的水平，以治疗以异常的MCJ多肽活性为特征的代谢疾病或状况。如本文其他地方所述，在本发明的一些实施方案中，可以通过本发明方法的治疗来提高或降低MCJ多肽或其活性的水平的细胞可包括但不限于：肝细胞、肌肉细胞、心肌细胞、循环细胞、神经元细胞、胶质细胞、脂肪细胞、皮肤细胞、造血细胞、上皮细胞、精子、卵母细胞、肌肉细胞、脂肪细胞、肾脏细胞、肝细胞或胰腺细胞。在本发明的一些实施方案中，细胞是癌细胞，其一个实例可以是肿瘤细胞。

[0066] 如本文使用的，术语“治疗”在用在疾病(如以异常的MCJ多肽活性为特征的代谢疾病或状况)时，可以指降低对象发生疾病或状况的可能性的预防性治疗，也可以指在对象发生疾病或状况之后为了消除疾病或状况或者降低疾病或状况的水平、防止疾病或状况恶化(例如更严重)和/或与不存在治疗时相比减缓疾病的进展的治疗。

[0067] 在本发明的某些实施方案中，改变MCJ多肽活性包括提高或降低细胞、组织或对象中MCJ多肽的功能。在一些这样的实施方案中，不改变MCJ多肽的水平，但是可改变(例如提高或降低)细胞中一种或更多种MCJ多肽的功能。可改变MCJ多肽之功能的方法的实例可以包括但不限于使MCJ多肽与结合MCJ多肽并改变其功能的抗体或其功能片段接触。例如，在本发明的一些实施方案中，可以将抑制MCJ功能的抗体递送到细胞中作为治疗方案的一部分。相似地，在本发明的一些实施方案中，可以将增强或抑制MCJ功能的化合物施用到细胞或对象中而导致调节MCJ多肽活性。增强或抑制MCJ多肽功能和/或增强或抑制MCJ多肽水平的化合物在本文中可以称为MCJ调节化合物。

[0068] 在本发明的一些实施方案中，MCJ调节化合物可以包括MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂或小分子MCJ增强剂。MCJ分子的实例包括MCJ多肽或编码MCJ

多肽的核酸。如本文使用的，MCJ调节化合物可以是调节(例如，提高或降低)细胞、组织和/或对象中MCJ多肽活性的化合物。减小或降低MCJ多肽活性的MCJ调节化合物可称为MCJ抑制剂化合物，而提高或增强MCJ多肽活性的MCJ调节化合物可称为MCJ增强剂化合物。

[0069] 因此，可以向需要治疗代谢疾病或状况的对象施用有效量的提高或降低MCJ多肽活性的化合物。向对象施用提高MCJ多肽活性的化合物或降低MCJ多肽活性的化合物可降低对象中的代谢疾病或状况。

[0070] 在希望使用本发明的治疗和/或化合物来降低MCJ多肽活性的某些代谢疾病和/或状况中，可施用MCJ抑制化合物。这样的代谢疾病或状况的非限制性实例包括但不限于：超重、体重增加、肥胖、非酒精性脂肪肝疾病、糖尿病、胰岛素抗性、酒精性脂肪肝疾病、血脂异常、脂肪变性(例如，肝脂肪变性、心脏脂肪变性、肾脂肪变性、肌肉脂肪变性)、无β脂蛋白血症、糖原贮积病、韦-克病、脂肪营养不良；肝疾病，包括但不限于：肝炎症、肝炎、脂肪肝炎、丙型肝炎、基因型3丙型肝炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、妊娠期急性脂肪肝和威尔逊病；肾病；心脏病，包括但不限于：高血压、局部缺血、心力衰竭、心肌病；中毒；HIV；神经退行性疾病，包括但不限于：帕金森病、阿尔茨海默病；体育锻炼；和癌症。在本发明的一些实施方案中，代谢疾病或状况是高胆固醇，可使用本发明的降低MCJ活性的方法来减少细胞、组织或对象中的胆固醇。

[0071] 在希望使用本发明的治疗和/或化合物来提高MCJ多肽活性的某些代谢状况中，可施用MCJ增强化合物。这样的代谢疾病或状况的非限制性实例包括但不限于：进食障碍，包括但不限于厌食症、饥饿、营养不良、全肠胃外营养、严重的体重下降、体重不足、再喂养综合征；胃肠道手术介导的代谢改变，包括但不限于空肠-髂骨旁路术、胃旁路术；以及炎性/感染性状况，包括但不限于细菌过度生长的空肠憩室病和炎性肠病。

[0072] 在本发明的一些实施方案中，用于治疗希望改变或调节MCJ多肽活性的代谢疾病或状况的化合物可以是MCJ多肽或编码MCJ多肽的核酸。因此，本发明方法可包括向对象施用外源MCJ多肽或外源MCJ多肽编码核酸。

[0073] 如本文使用的，术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用，因此术语多肽可用于指全长蛋白质，也可用于指全长蛋白质的片段。如本文关于多肽、蛋白质或其片段，以及编码该多肽的核酸所使用的，术语“外源”意指向细胞或对象施用化合物，并且所述化合物并非天然存在于细胞或对象中。应理解，外源MCJ多肽或MCJ多肽编码核酸可能分别与内源MCJ多肽或MCJ多肽编码核酸在其序列方面相同，但是被施用于细胞或对象。

[0074] 根据本发明的一些方面，可以在本发明的方法中施用全长MCJ多肽或者全长MCJ多肽的片段。本发明的片段可以是保留了多肽的独特功能能力的片段。可保留在片段中的功能能力包括与抗体的相互作用以及与其他多肽或其片段的相互作用。多肽片段可以是天然片段，或者可以使用本领域已知方法合成，并且使用本文示例的方法测试功能。可用在本发明的方法和组合物中的全长MCJ和MCJ的片段可以是重组多肽。

[0075] 全长MCJ多肽的片段可以包含全长MCJ多肽的至多n-1个连续氨基酸，所述全长MCJ多肽具有野生型MCJ多肽或本文所述经修饰的MCJ多肽序列(其中“n”等于全长MCJ多肽中氨基酸的数目)中发现的连续序列。因此，例如，长150个氨基酸之MCJ多肽的片段可以是150个氨基酸之MCJ多肽的至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140或149(包括之间的每个整

数)个连续氨基酸。在一些实施方案中,片段包含MCJ多肽的C末端区域。作为全长MCJ多肽之片段的这些MCJ多肽可用于多种目的,包括作为MCJ调节化合物施用以及用于制备MCJ调节化合物,例如特异性结合合成和天然MCJ多肽的抗体。

[0076] "经修饰的"野生型或突变体全长MCJ多肽或者作为其片段的多肽可包括缺失、点突变、截短、氨基酸替换和/或氨基酸或非氨基酸部分的添加。可通过修饰编码多肽之核酸来修饰本发明的多肽,或者替选地,可直接修饰多肽,例如通过切割、添加接头分子、添加可检测部分(例如,荧光标记)等。修饰还包括含多肽氨基酸序列的全部或一部分的融合蛋白。

[0077] 一般来说,经修饰的多肽(例如,经修饰的MCJ野生型或突变体多肽)可包括进行了特定修饰以改变与其生理活性无关的多肽特性的多肽。例如,可替换或缺失半胱氨酸残基以避免不需要的二硫键。可在多肽的N末端或C末端添加残基,例如可以在MCJ多肽的C末端尽头处添加半胱氨酸(C)或其他氨基酸残基。可以合成具有修饰的MCJ多肽和/或通过选择并引入氨基酸替换、缺失或添加来在MCJ多肽中进行修饰。然后测试经修饰多肽的一种或更多种活性(例如,调节细胞或对象中MCJ多肽的活性、治疗代谢疾病或状况、改变线粒体膜的去极化等)以确定哪种修饰提供了具有期望特性的经修饰多肽。

[0078] 本领域技术人员还将认识到,可以在多肽中进行保守氨基酸替换以提供功能等效的多肽,即,保留了未经修饰的MCJ多肽在本发明治疗方法中的功能能力的经修饰MCJ多肽。本文使用的"保守氨基酸替换"是指不改变进行了氨基酸替换之多肽的相对电荷或尺寸特性的氨基酸替换。可根据改变多肽序列的方法和本领域普通技术人员已知的方法制备经修饰MCJ多肽。示例性功能等效的MCJ多肽包括MCJ多肽或其片段的保守氨基酸替换,例如,经修饰的MCJ多肽。氨基酸的保守替换包括在以下组内氨基酸之间进行的替换:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。

[0079] 通常通过改变编码多肽的核酸来进行MCJ多肽中的保守氨基酸替换。这种替换可通过本领域普通技术人员已知的多种方法进行。例如,可以通过PCR定向突变、定点诱变或通过化学合成编码MCJ多肽的基因来进行氨基酸替换。当对小的多肽片段进行氨基酸替换时,可通过直接合成多肽来进行替换。可如下测试MCJ多肽的功能等效片段的活性:将编码经改变之多肽的基因克隆到细菌或哺乳动物表达载体中,将载体引入到合适的宿主细胞中,表达改变的多肽,并且如本文所公开测试多肽的功能能力。

[0080] 在本发明的一些实施方案中,可通过在遗传上将MCJ多肽引入到细胞和/或线粒体中来调节MCJ多肽的水平或功能,并且提供了遗传靶向地表达MCJ多肽的试剂和方法。可使用遗传靶向来将MCJ多肽递送到特定细胞类型、特定细胞亚型、生物体内的特定空间区域以及细胞内的亚细胞区域。遗传靶向还涉及控制所表达MCJ多肽的量和表达时间。本发明的一些实施方案包括用于遗传靶向地表达MCJ多肽的试剂,其中所述试剂包含有含编码MCJ多肽或编码MCJ多肽功能片段之核酸的载体。

[0081] 如本使用的,术语"载体"是指能够在不同遗传环境之间转运已与之有效连接的另一核酸的核酸分子。术语"载体"还指能够转运核酸分子的病毒或生物体。一种载体类型是附加体(episome),即能够在染色体外复制的核酸分子。一些有用的载体是能够自主复制和/或表达与之连接的核酸的那些载体。能够指导与之有效连接之基因的表达的载体在本文中称为"表达载体"。另一些有用的载体包括但不限于:病毒,例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和噬菌体。可用在本发明的一些方法中的载体可以在遗传学上将MCJ多肽插入到分裂

和未分裂的细胞中，并且可以将MCJ多肽插入到为体内、体外或离体细胞的细胞中。

[0082] 可用在本发明的方法中的载体可包括另外的序列，包括但不限于一种或更多种信号序列和/或启动子序列或其组合。表达载体及其使用方法是本领域中周知的。在本发明的某些实施方案中，载体可以是包含编码本发明MCJ多肽或其变体之核酸或基因的慢病毒。慢病毒是可用于产生稳定细胞系的载体的非限制性实例。本文使用的术语“细胞系”是指已建立的细胞培养物，其在给予合适培养基时将持续增殖。

[0083] 可用在本发明的方法和载体中的启动子包括但不限于：细胞特异性启动子或通用启动子。选择和使用细胞特异性和通用启动子的方法是本领域中周知的。通用目的启动子的非限制性实例允许在广泛种类细胞类型中表达MCJ多肽，因此可使用在多种细胞类型中广泛表达之基因(例如，管家基因)的启动子来在多种细胞类型中表达MCJ多肽。在本文其他地方提供了通用启动子的非限制性实例，合适的可替选启动子是本领域中周知的。在本发明的某些实施方案中，启动子可以是诱导型启动子，其实例包括但不限于四环素开或四环素关等。

[0084] 本发明的某些方面包括施用特异性结合MCJ多肽的抗体或其抗原结合片段以改变MCJ多肽活性(例如降低MCJ多肽活性)的方法。在本发明的一些实施方案中，可以向细胞和/或对象施用这样的抗体或其抗原结合片段以抑制细胞和/或对象中的MCJ多肽活性。本文使用的术语抗体的“抗原结合片段”是指保留了特异性结合抗原(例如，MCJ多肽)之能力的抗体的一个或更多个部分。可使用已知的方法和常规程序来制备和测试用于本发明方法的MCJ调节抗体的抗原结合片段。在本发明的一些实施方案中，抗体是重组抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体或嵌合抗体，或者这些抗体的混合物。

[0085] 已知特异性结合本文SEQ ID NO:1所示MCJ多肽的抗体的实例包括但不限于单克隆抗体：i)WN.F3，由杂交瘤N-MCJ 3C1.3F3产生，所述细胞以ATCC no.#PTA-8135保藏；ii)WN.A12，由杂交瘤细胞系N-MCJ 3C1.5A12产生，所述细胞以ATCC no.#PTA-8133保藏；以及iii)由杂交瘤细胞系N-MCJ 2A2.5E4产生，所述细胞以ATCC no.#PTA-8134保藏(参见美国专利公开US20100129931，公开于2010年5月27日，其通过引用并入本文)。可以用在本发明方法中作为MCJ调节化合物的抗体的实例是WN.F3、WN.A12和WN.E4抗体。用于本发明方法的另外的抗体可使用本领域中已知的方法并结合本文公开内容以及美国专利公开US20100129931中的公开内容产生并测试。

[0086] 可在本发明治疗方法中施用的另外的化合物包括抑制MCJ多肽活性的小分子或化学物质，以及增强MCJ多肽活性的小分子或化学物质。鉴别和测试这些小分子和化学物质的方法可包括使用本领域已知的文库筛选和测试程序，并结合本文提供的教导。

[0087] 本发明的MCJ多肽调节化合物可单独施用，或与一种或更多种另外的化合物组合施用。在一些实施方案中，本发明化合物可与一种或更多种其他治疗剂或治疗协同作用，并且提高一种或更多种治疗剂或活性的效果。因此，例如，结合热量减少治疗来施用抑制MCJ多肽活性的化合物可增强热量减少治疗的效果。因此，MCJ抑制剂化合物可协同作用以提高可施用以治疗代谢疾病或状况的一种或更多种药剂或治疗的效果。

[0088] 应理解，可在本发明方法中鉴别并使用另外的MCJ调节化合物。例如，可使用本文所述测定和方法测试候选化合物提高MCJ多肽活性(水平和/或功能)的能力以及其治疗代谢疾病或状况的能力。

[0089] 在本发明的治疗方法中，本文所述本发明的MCJ调节化合物(例如，包含MCJ分子、抗MCJ多肽抗体或其功能片段、小分子MCJ抑制剂或小分子MCJ增强剂等的化合物)可单独使用或结合其他分子使用，例如靶向剂、标记试剂(labeling agent)和/或细胞毒素剂。

[0090] 可根据本发明方法使用的靶向剂是将本发明化合物导向特定的待治疗细胞类型或细胞器的那些试剂，所述细胞类型例如肝细胞、肌肉细胞、心肌细胞、循环细胞、神经元细胞、胶质细胞、脂肪细胞、皮肤细胞、造血细胞、上皮细胞、精子、卵母细胞、肌肉细胞、脂肪细胞、肾脏细胞、肝细胞或胰腺细胞，所述细胞器例如线粒体。靶向化合物的选择将取决于代谢疾病或状况的性质。在一些情况下，可能希望将试剂靶向骨骼肌、心肌、肾、肝、脑等。本领域普通技术人员将知道并且能够选择和使用用于本发明方法的合适的靶向剂。用于线粒体的靶向剂的非限制性实例是基于短杆菌肽S的线粒体靶向剂，这是使用肉碱-酰基肉碱移位酶系统、细胞色素、苹果酸脱氢酶的试剂。可用在本发明的一些实施方案中的靶向信号的实例由以下文献给出：Diekert,K.等，PNAS(1999)，第96卷，No.21，11752-11757；Addya,S.等，J.Cell Biology，(1997)第139卷，No.3，589-599；Del Gaizo,V.等，(2003)Mol.Gen.and Metabol.第80卷，170-180，其通过引用并入本文。

[0091] 在本发明方法中可使用标记试剂以确定MCJ多肽在细胞和组织中的定位，其还可用于评估已施用的治疗化合物的细胞、组织或细胞器位置。附接并使用标记试剂如酶标记、染料、放射性同位素标记等的方法是本领域中周知的。

[0092] 可通过利用与其他治疗代谢疾病或状况的方法组合来增强本发明的组合物、化合物和方法。在一些情况下，治疗方法可包括施用另外的治疗剂或另外的治疗，例如药物和/或行为治疗、热量限制、手术等。因此，在本发明的一些实施方案中，可结合用于治疗代谢疾病或状况的疗法(例如，热量限制、增加身体活动、手术等)来施用本发明化合物(例如，施用抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂)。包括施用MCJ调节化合物的本发明治疗方法可用在代谢疾病或状况之前的任何阶段，或当代谢疾病或状况处于随后的阶段时，包括但不限于代谢疾病或状况的早期阶段、中期阶段和晚期阶段，包括任意这些阶段之前和之后的所有时间。本发明方法也可用于之前已经利用一种或更多种其他药物或行为治疗方法进行了治疗但是所述治疗在减缓或停止对象中代谢疾病或状况的进展方面不成功、最低限度地成功和/或不再成功的对象。

[0093] 治疗有效量

[0094] 以治疗代谢疾病或状况的有效量向对象施用本发明的MCJ调节化合物(例如抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等)。“治疗代谢疾病或状况的有效量”是对于实现期望的生物效应而言必要的或足够的量。例如，本发明化合物的有效量可以是(i)减缓或停止代谢疾病或状况的进展；或(ii)逆转代谢疾病或状况的一种或更多种症状的必要的量。根据本发明的一些方面，有效量是本发明化合物在单独或与另一种药物或治疗组合时的量，在预防或治疗代谢疾病或状况中，当组合或共施用或单独施用时，所述量导致对代谢疾病或状况的治疗响应。生物效应可以是改善或绝对消除代谢疾病或状况引起的症状。在另一个实施方案中，生物效应是完全消除代谢疾病或状况，如通过指示对象不具有所述疾病或状况的诊断测试所证明的。

[0095] 通常，在临床试验中确定提高MCJ多肽活性之化合物或药物或者降低MCJ多肽之化合物或药物的有效量，所述试验在盲性研究中建立受试群体相对于对照群体的有效剂量。

在一些实施方案中，有效量是导致期望响应的量，例如使患有代谢疾病或状况的对象的细胞或组织中的代谢疾病或状况降低的量。因此，治疗以降低的MCJ多肽活性为特征的代谢疾病或状况和/或希望提高MCJ多肽活性的代谢疾病或状况的有效量可以是当施用时使对象中MCJ多肽活性量提高到比未施用组合物时对象或组织中发生的量高的量。相似地，治疗以提高的MCJ多肽活性为特征的代谢疾病或状况和/或希望降低MCJ多肽活性的代谢疾病或状况的有效量可以是当施用时使细胞、组织和/或对象中MCJ多肽活性降低到比未施用组合物或药物时对象或组织中发生的量低的量。在治疗代谢疾病或状况的情况下，期望的响应可能是降低或消除细胞、组织和/或对象中代谢疾病或状况的一种或更多种症状。降低或消除可以是暂时的或可以是永久性的。可使用测定MCJ多肽活性或编码MCJ多肽之核酸的水平的方法来监测代谢疾病或状况的状态。在本发明的一些方面，治疗代谢疾病或状况的期望响应也可能是延迟代谢疾病或状况的发作或甚至阻止代谢疾病或状况的发作。

[0096] 还可通过评估施用对于细胞或对象的生理作用(例如，施用后代谢疾病或状况降低)来确定调节(提高或降低)MCJ多肽活性的化合物(在本文中也称为药物化合物)的有效量。适于确定本发明药物化合物的效力的测定是本领域技术人员已知的，并且可用于测量对于治疗的响应水平，以及可至少部分地根据这些测量值来改变向对象施用的药物化合物的量。治疗量可通过例如增加或减少治疗组合物的量、改变所施用的治疗组合物、改变施用途径、改变给药时间等而不同。有效量将随着以下因素而改变：被治疗的特定状况、被治疗对象的年龄和身体状况；状况的严重程度、治疗的持续时间、共同治疗(如有的话)的性质、特定施用途径以及健康从业者的知识和专业技术内的其他因素。例如，有效量可取决于个体具有异常低或异常高MCJ多肽活性水平的程度，和/或获得对代谢疾病或状况的有效治疗所期望的MCJ多肽活性水平。

[0097] 本发明化合物在治疗代谢疾病或状况或降低发生代谢疾病或状况的风险方面的有效量可根据所使用的特定化合物、化合物的递送方式以及是单独使用还是组合使用而改变。用于任何特定应用的有效量也可根据这些因素而改变，例如被治疗的代谢疾病或状况、所施用的特定化合物、对象的体型或代谢疾病或状况的严重程度。技术人员可根据经验确定本发明特定化合物的有效量，而不需要过多实验。结合本文提供的教导，通过在各种活性化合物和加权因子之间选择，可以计划出不造成大量毒性而对治疗特定对象完全有效的有效预防或治疗性治疗方案，所述加权因子例如效力、相对生物利用度、患者体重、不利副作用的严重程度和优选施用方式。

[0098] 可由个人卫生保健提供者或兽医调节药物化合物剂量，特别是在任何并发症的情况下。治疗有效量通常在0.01mg/kg至约1000mg/kg、约0.1mg/kg至约200mg/kg、或约0.2mg/kg至约20mg/kg之间变化，每天施用1次或更多次给药，持续一天或更多天。绝对量取决于多种因素，包括同时进行的治疗、给药次数和个体对象参数，包括年龄、身体状况、体型和体重。这些是本领域普通技术人员周知的因素，仅通过常规实验就能确定。在一些实施方案中，可使用最大剂量，即，根据合理医学判断的最高安全剂量。

[0099] 还构想了本发明化合物的多次剂量。在一些情况下，本发明化合物(例如，抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等)可以至少每天、每隔一天、每周、每隔一周、每月等施用。该剂量可以每天施用一次或每天超过一次，例如在一个24小时周期中施用2、3、4、5或更多次。

[0100] 本发明的药物化合物可单独施用、彼此组合和/或与向患有代谢疾病或状况的对象施用的其他药物治疗或其他治疗方案组合。在前述方法中使用的药物组合物优选是无菌的，并且包含有效量的治疗化合物，所述化合物在适于向对象施用的单位重量或体积下将MCJ多肽活性调节到足以产生期望的响应的水平。

[0101] 可根据不同参数选择向对象施用的调节MCJ多肽活性之组合物的剂量，特别是根据所使用的施用方式和对象的状态。其他因素包括期望的治疗时期。在施用初始剂量时对象中的响应不足的情况下，可在患者耐受允许程度内使用更高剂量(或通过不同的更加局域化的递送途径的有效更高剂量)。

[0102] 施用方法

[0103] 对于MCJ调节化合物，可以使用多种施用途径。所选择的特定递送方式无疑将取决于被治疗的特定状况和治疗效力所需的剂量。一般来说，本发明方法可使用任何医学上可接受的施用方式来实施，意指产生有效的保护水平而不造成临床上不可接受的副作用的方式。在本发明的一些实施方案中，可经口、肠、粘膜、经皮和/或肠胃外途径来施用本发明的化合物。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内和胸骨内注射或输注技术。其他途径包括但不限于鼻(例如，通过胃-鼻管)、真皮、阴道、直肠和舌下。本发明的递送途径可包括鞘内、心室内或颅内。在本发明的一些实施方案中，可将本发明化合物放置在缓释基质中并通过将基质放置在对象中来施用。在本发明的一些方面，可使用包被有靶向特定细胞或细胞器(非限制性实例是线粒体)的递送剂(delivery agent)的纳米颗粒来将化合物(例如，抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等)递送到对象细胞。

[0104] 可以在制剂中施用本发明化合物，所述制剂可以在可药用溶液剂中施用，所述溶液剂通常可包含可药用浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容载体、佐剂和任选的其他治疗成分。根据本发明方法，可以在药物组合物中施用所述化合物。通常，药物组合物包含本发明的化合物和可药用载体。可药用载体是本领域普通技术人员周知的。如本文使用的，可药用载体意指不干扰活性成分的生物活性效力的无毒材料，例如化合物(例如，抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等)治疗代谢疾病或状况的能力。

[0105] 可药用载体包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和其他本领域中周知的材料。示例性可药用载体描述在美国专利No.5,211,657中，其他的是本领域技术人员已知的。这些制剂通常可包含盐、缓冲剂、防腐剂、相容载体和任选地其他治疗剂。当在药物中使用时，盐应是可药用盐，但是非可药用盐可方便地用于制备其可药用盐，其并未排除于在本发明的范围之外。这些药理学上和药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的那些：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。另外，可由碱金属盐或碱土金属盐制备可药用盐，例如钠盐、钾盐或钙盐。

[0106] 本发明化合物可直接向组织施用。在一些实施方案中，施用化合物的组织是可能出现代谢疾病或状况的组织。直接的组织施用可通过直接注射来实现。化合物可施用一次，或替选地其可施用多次。如果施用多次，化合物可通过不同途径施用。例如，第一次(或开始几次)施用可直接施用到受影响的组织中，而随后的施用可以是全身性的。

[0107] 当希望全身性递送时，可将化合物配制成用于通过注射肠胃外施用，例如，通过快

速浓注或持续输注。用于注射的制剂可以单位剂型(例如,在安瓶中或在多剂量容器中)存在,添加或不添加防腐剂。组合物可采取以下形式:如在油或水性载体中的混悬剂、溶液剂或乳剂,并且可包含配制剂,例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0108] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液剂、混悬剂和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和注射用有机酯(例如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇/水溶液剂、乳剂或混悬剂,包含盐和缓冲介质。肠胃外载剂包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格液或不挥发油。静脉内载剂包括液体和营养补充物、电解质补充物(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等。还可存在防腐剂和其他添加剂,例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。由其他施用形式(例如静脉内施用)将产生较低剂量。在患者对所施用的初始剂量响应不足的情况下,可在患者耐受允许程度之内使用更高剂量(或通过不同的更加局域化的递送途径实现的有效更高剂量)。可根据需要每天使用多个剂量以获得合适的全身或局部化合物水平。

[0109] 在另一些实施方案中,递送载体是适合于植入到哺乳动物接受者中的生物相容性微粒或植入物。可根据该方法使用的示例性生物可腐蚀植入物描述在PCT公开No.WO 95/24929(通过引用并入本文)中,其描述了用于包含生物大分子的生物相容性生物可降解聚合物基质。这些递送方式是本领域技术人员周知的,并且可用于在对象中实现得本发明化合物的持续释放,并且可选择为不降解而是通过扩散在延长的时间段内释放。

[0110] 可使用非生物可降解和生物可降解聚合物基质二者来向对象递送本发明化合物。在一些实施方案中,基质可以是生物可降解的。基质聚合物可以是天然或合成聚合物。可基于所希望的释放时间段(通常为数小时至一年或更久)来选择聚合物。通常,可使用数小时和三至十二个月之间的释放时期。聚合物可选地为水凝胶形式,其可吸收高达其重量的约90%的水,并且任选地,进一步与多价离子或其他聚合物交联。

[0111] 通常,可使用生物可腐蚀植入物通过扩散或通过聚合物基质的降解来递送本发明化合物。用于这些用途的示例性合成聚合物是本领域中周知的。可使用生物可降解聚合物和非生物可降解聚合物使用过本领域已知方法来递送本发明的化合物。可使用生物粘附聚合物(如生物可腐蚀水凝胶)(参见,H.S.Sawhney,C.P.Pathak和J.A.Hubell,Macromolecules中,1993,26,581-587,其教导并入本文)递送本发明化合物用于治疗。另外的合适递送系统可包括时间释放、延迟释放或持续释放递送系统。这些系统可避免重复施用本化合物,提高对象和医师的便利性。许多类型的释放递送系统是可获得并且是本领域技术人员已知的(参见,例如,美国专利No.5,075,109;4,452,775;4,675,189;5,736,152;3,854,480;5,133,974;和5,407,686(其教导通过引用并入本文)。另外,可使用基于泵的硬件递送系统,其中一些被改造用于植入。

[0112] 长期持续释放植入物的使用可尤其适合于对象的预防性治疗和处于发生复发的代谢疾病或状况风险之下的对象。本文使用的长期释放意指植入物被构建和设置为递送治疗水平的活性成分至少30天、60天、90天或更久。长期持续的释放植入物是本领域普通技术人员周知的,并且包括上述释放系统中的一些。

[0113] 本发明化合物的治疗性制剂可被制备成通过将具有期望纯度的化合物与任选地可药用载体、赋形剂或稳定剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences 21版,(2006))以冻干制剂或水溶液的形式储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用剂量和浓

度下对接受者无毒，并且包括缓冲剂如磷酸、柠檬酸和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(例如，十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六烃季铵；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；烷基对羟基苯甲酸酯，例如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量(小于约10个残基)多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例如EDTA；糖，如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；盐形成反离子，例如钠；金属配合物，(例如，Zn糖蛋白复合体)；和/或非离子表面活性剂，例如TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。

[0114] 检测试验和诊断

[0115] 本发明的某些方面包括评估以异常MCJ多肽活性为特征的代谢疾病或状况之状态的方法。这样的方法可包括测定MCJ多肽的水平或功能，并将所测得的水平或功能与对照水平或功能比较。在本发明的一些实施方案中，方法包括在检测细胞和/或对象中MCJ多肽或编码MCJ多肽之核酸的水平的测定中使用特异性结合MCJ多肽的抗体或抗原结合片段。这样的测定可包括获得来自对象的生物样品，测定生物样品中MCJ分子的水平，以及将所述水平与对照水平比较。本文使用的生物样品可以是体外生物样品或者可以是在体内检测(例如，获得)的样品。本文使用的生物样品可以是细胞样品、组织样品、血液样品、体液样品、亚细胞样品等。生物样品可包括细胞、组织或细胞器，并且可包含多种细胞类型，例如但不限于：肝细胞、肌肉细胞、心肌细胞、循环细胞、神经元细胞、胶质细胞、脂肪细胞、皮肤细胞、造血细胞、上皮细胞、精子、卵母细胞、肌肉细胞、脂细胞、肾脏细胞、肝细胞、胰腺细胞等。在本发明的一些实施方案中，生物样品可包含一种或更多种癌细胞。在本发明的某些实施方案中，生物样品不包含癌细胞。

[0116] 用于评估以异常的MCJ多肽活性为特征的代谢疾病或状况的测定可包括但不限于：(1)表征对象中MCJ多肽活性对代谢疾病或状况的治疗的影响；(2)评估治疗对对象中MCJ多肽活性(例如，水平和/或功能)的改变；(3)至少部分地基于在对象细胞中测定的MCJ多肽活性来选择用于代谢疾病或状况的治疗；以及(4)确定对象中代谢疾病或状况的状态。因此，使用本发明方法的一些实施方案可表征对象、可监测治疗方案、可选择治疗以及可更好地理解疾病状态。例如，本发明的抗体或其抗原结合片段以及本发明的其他方法可用于测量或确定细胞和/或对象中的MCJ多肽活性，其可直接指示细胞和/或对象中的代谢疾病或状况。

[0117] 本发明在一些方面包括测定MCJ多肽活性的多种测定。本发明方法的可用于测定细胞、组织、对象和样品(例如，来自对象、在培养物中等)中的MCJ多肽活性(MCJ多肽的水平和/或功能)的方法，包括但不限于：结合测定，例如使用特异性结合MCJ多肽的抗体或其抗原结合片段；凝胶电泳；质谱；NMR等。可根据本发明使用的免疫测定包括但不限于：夹心型测定(sandwich-type)、竞争性结合测定、一步直接测试(one-step direct test)和两步测试，例如本领域通常使用过的那些。也可使用本领域已知的可检测标记和合适的体内方法在体内(在活的对象中)进行对特异性结合MCJ多肽的抗体之结合的评估。

[0118] 本发明的方法和测定(例如，结合测定、凝胶电泳、质谱、NMR等)可用于确定对象或

细胞样品(例如,细胞培养物)中MCJ多肽活性随时间的改变。这允许监测将要进行代谢疾病或状况之治疗的对象中的MCJ多肽活性,并且还能够监测当前正进行代谢疾病或状况的治疗的对象。因此,本发明方法可用于诊断或评估对象中的代谢疾病或状况,还可用于评估代谢疾病或状况的治疗性治疗的效力,以评估不同时间点对象中MCJ多肽的活性。例如,可在开始治疗方案之前(预防或治疗代谢疾病或状况)、治疗方案期间和/或治疗方案之后测定对象的MCJ多肽活性,从而提供对象中代谢疾病或状况的状态信息。

[0119] 也可使用本发明测定在来自培养物的细胞中对提高或降低细胞或组织中MCJ多肽编码核酸或MCJ多肽的表达的候选MCJ调节化合物的效力进行评估,例如,作为筛选测定来评估调节MCJ多肽活性的候选MCJ调节化合物。改变细胞、组织或对象中MCJ多肽活性的MCJ调节化合物可用于治疗代谢疾病或状况或作为代谢疾病或状况的预处理(例如,制备用于随后处理的细胞或对象)。

[0120] 应理解,治疗方案可以是预防或治疗对象中的代谢疾病或状况。本发明在一些方面提供了可用于监测对象对于提供给对象的代谢疾病或状况之预防性治疗和/或处理的响应的方法。本发明的方法(例如,结合测定、凝胶电泳、质谱、NMR等)还可用于监测处于发生代谢疾病或状况的风险下的对象中代谢疾病或状况的发作、进展或消退。可测定在间隔的时间获自对象的两个、三个、四个或更多个生物样品中的MCJ多肽活性。可对样品中测定的MCJ多肽活性进行比较并可将活性随时间的变化用于评估对象(或者细胞或组织样品)中代谢疾病或状况的状态和阶段,和/或治疗策略对于对象(或者细胞或组织样品)中代谢疾病或状况的影响。通过提供代谢疾病或状况的指标,可用特异性结合MCJ多肽的抗体或其片段获得有用的预后信息,并且可用于为对象选择治疗,例如选择药物治疗、行为治疗、手术治疗等。

[0121] 本文所述测定可包括测定MCJ多肽活性,包括但不限于测定细胞、组织和对象中编码MCJ多肽的核酸的水平和/或测定MCJ多肽的水平。当实施本发明的多种方法时,可以多种方式测定MCJ多肽编码核酸和多肽的水平。在本发明的一些实施方案中,分别相对于MCJ多肽编码核酸或多肽的对照水平测量细胞、组织或对象中MCJ多肽编码核酸或多肽的水平。一种MCJ多肽编码核酸或多肽水平的可能测量是测量MCJ多肽编码核酸或多肽的绝对水平。这可表示为例如每细胞或组织单位中的MCJ多肽编码核酸或多肽。另一种MCJ多肽编码核酸或多肽水平的测量是测量MCJ多肽编码核酸或多肽的水平随时间的变化。这可表示为绝对量或可表示为随时间提高或降低的百分比。特异性结合MCJ多肽的抗体或抗原结合片段或其他化合物或者编码MCJ多肽的核酸可用于单独用于诊断方法,或者结合本领域已知的某些抗体或结合化合物。已知抗体可包括特异性结合与代谢疾病或状况相关的其他蛋白质或可用于量化每细胞单位的MCJ多肽编码核酸或多肽水平的其他细胞标志物蛋白等的抗体。

[0122] 如上所述,也可使用本发明化合物(例如,抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等)通过监测MCJ多肽活性随时间的变化来表征MCJ多肽活性。例如,在某些代谢疾病和状况中,MCJ多肽活性的提高与细胞和/或组织中提高的代谢疾病或状况的可能性有关,而在某些代谢疾病和状况中,MCJ多肽活性的降低与细胞和/或组织中提高的代谢疾病或状况的可能性有关。另外,某些代谢疾病和状况可能不直接以异常的MCJ多肽活性为特征,但可通过调节(一些情况下提高,而另一些情况下降低)MCJ多肽活性进行治疗。在每一种代谢疾病或状况中,可能希望评估经治疗细胞、组织或对

象中的MCJ多肽活性。

[0123] 因此，可监测随时间的MCJ多肽活性水平以确定对象或细胞培养物中代谢疾病或状况的状态是否改变。MCJ多肽活性的改变，例如MCJ多肽活性的提高或降低超过基线活性水平、之前活性水平或对照活性水平的0.1％，可分别作为本发明治疗对于降低或提高MCJ多肽活性的效力或需要进行本发明治疗的指标。

[0124] 在本发明的一些实施方案中，细胞或组织中MCJ多肽活性的提高可以是比对象中之前的MCJ多肽活性提高超过0.2％、超过0.5％、超过1.0％、2.0％、3.0％、4.0％、5.0％、7.0％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％或更多。在本发明的一些实施方案中，细胞或组织中MCJ多肽活性水平的降低可以是降低超过0.2％、超过0.5％、超过1.0％、2.0％、3.0％、4.0％、5.0％、7.0％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、50％或更多。MCJ多肽活性测定值随时间的提高或降低可指示样品或对象中代谢疾病或状况状态的改变，代谢疾病或状况的治疗效力，或代谢疾病或状况中期望的MCJ多肽活性水平的获得。

[0125] 对于代谢疾病或状况状态的确定，本发明方法可用于测定在不同时间采集的两个或更多个样品中的MCJ多肽活性，并且将彼此的测定值和/或与对照MCJ多肽活性水平进行比较。这些比较可用于确定对象中代谢疾病或状况的状态并允许评估代谢疾病或状况的治疗。对在不同时间和/或不同天从对象获得的生物样品中所测量的对象MCJ多肽活性的比较，可用作对对象中代谢疾病或状况任何治疗之效力的测量。本领域普通技术人员将认识到，通过评估响应于使细胞与用于治疗代谢疾病或状况的候选药剂或用于调节MCJ多肽活性的候选药剂相接触所发生的细胞MCJ多肽活性的任何变化，可在体外测试治疗方法和候选治疗的效力。

[0126] 本领域普通技术人员将理解，也可根据对代谢疾病或状况的症状或临床终点的评价来评价治疗，这种评价可结合本发明方法来评估代谢疾病或状况的状态和/或代谢疾病或状况之治疗的效力。

[0127] 试剂盒

[0128] 本发明范围内还具有包括本发明组合物和使用说明书的试剂盒。本发明试剂盒可包括可用于治疗代谢疾病或状况或者在本发明一些方面中用于诊断或监测代谢疾病或状况的一种或更多种化合物，例如抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等。可制备包含化合物如抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等的试剂盒，以用于治疗方法、体外诊断、预后和/或使用任何合适的组织学、细胞学、血清学或其他方法来监测细胞、组织和/或对象中的MCJ多肽活性水平。本发明试剂盒的组分可包装在水性介质中或包装为冻干形式。本发明试剂盒可包括被划区以在其中紧密容纳一个或更多个容器装置或容器装置系列(如试管、小瓶、烧瓶、瓶、注射器等)的载体。第一容器装置或容器装置系列可包含一种或更多种化合物，例如化合物抗MCJ抗体或其功能片段、MCJ多肽编码核酸、MCJ多肽或者小分子MCJ增强剂或抑制剂等。第二容器装置或容器装置系列可包含能够将化合物递送到细胞或组织的靶向标签或接头-标签中间物。

[0129] 本发明试剂盒还可包括说明书。说明书通常是书面形式，并且提供用于通过试剂盒进行具体化测定或治疗的指导以及用于根据测定或治疗进行确定的指导。

[0130] 鉴定候选化合物的方法

[0131] 本发明的一些方面包括鉴定和/或筛选调节细胞、组织和/或对象中的MCJ多肽活性之候选药剂的方法。方法可包括将候选药剂与细胞或组织混合或混合到对象中，并且测定在与候选药剂接触之前和接触之后的MCJ多肽活性。与适当的对照相比，MCJ多肽活性量的提高表明药剂能够提高MCJ水平。与适当的对照相比，MCJ多肽活性量的降低表明药剂能够降低MCJ水平。

[0132] 可用来评估用于代谢疾病或状况之候选治疗的测定混合物包含候选药剂。候选药剂可以是抗体、小有机化合物、小分子、多肽、核酸等，因此可选自组合抗体文库、组合蛋白质文库、小有机分子文库或任何其他合适的来源。通常，平行进行具有不同药剂浓度的多个反应混合物的测定，以获得对于多种浓度的不同响应。通常，这些浓度中的一种作为阴性对照，即，药剂浓度为0或低于检测限的药剂浓度。

[0133] 可进行测试以便确定是否可用于调节MCJ多肽活性以及是否可用于治疗代谢疾病或状况的候选药剂可包括众多类化学物质、核酸、蛋白质等。在本发明的一些实施方案中，候选药剂是小有机化合物，即分子量超过50，但小于约2500，优选小于约1000，以及更优选小于约500的那些。候选药剂包含对于与多肽和/或核酸结构性相互作用所必需的化学官能团，并且通常包含至少氨基、羰基、羟基或羧基，优选包含至少两个所述化学官能团，更优选至少3个所述化学官能团。候选药剂可包含被一个或更多个上述官能团取代的环碳或杂环结构和/或芳烃或聚芳烃结构。候选药剂也可以是生物分子如多肽、糖、脂肪酸、固醇、类异戊二烯、嘌呤、嘧啶，上述物质的衍生物或结构类似物，或者它们的组合等。

[0134] 候选药剂获自多种来源，包括合成或天然化合物的文库。例如，多种手段可用于随机和定向合成多种有机化合物和生物分子，包括表达随机化寡核苷酸、合成有机组合文库、随机或非随机多肽的噬菌体展示文库、蛋白质或抗体的组合文库等。或者，细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物文库是可获得的或容易产生的。另外，可通过常规化学、物理和生物化学方法很容易地对天然和合成产生的文库和化合物进行修饰。另外，可对已知试剂进行定向或随机地化学抑修饰，例如酰化、烷基化、酯化、脒化(amidification)以产生药剂的结构类似物。

[0135] 测定混合物中也可包含多种其他试剂以测试候选化合物。这些可包括试剂如盐、缓冲剂、中性蛋白质(例如，白蛋白)、洗涤剂等，其可用于帮助优化蛋白质-蛋白质和/或蛋白质-试剂的结合。这样的试剂也可减少反应组分的非特异性或背景相互作用。也可使用另一些提高测定效力的试剂，例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂等。添加组分的顺序、孵育温度、孵育时间和其他测定参数可容易地确定。这样的实验仅涉及优化测定参数，而不是测定的基本组合物。孵育温度通常为4℃至40℃。可使孵育时间最小化以有利于快速、高通量地筛选，通常为0.1至10小时。在孵育后，可通过使用者可用的常规方法检测变量，如MCJ多肽的存在或不存在以及MCJ多肽活性。例如，可使用标准方法以及如本文所述通过测量可检测标记来确定MCJ多肽活性。

[0136] 提供了以下实施例来说明实施本发明的特定实例，其并未旨在限制本发明的范围。对于本领域普通技术人员而言显然的是，本发明将发现在多种组合物和方法中的应用。

[0137] 实施例实施例1

[0138] 方法

[0139] 小鼠。

[0140] C57B1/6J小鼠购自Jackson Laboratories(Bar Harbor,ME)。靶向MCJ的胚胎干细胞(RRN 226)获自Baygenomics[University of California San Francisco(UCSF),San Francisco,CA]。在佛蒙特大学(University of Vermont)转基因小鼠设施中,将基因捕获ES细胞注射到C57B1/6J囊泡中,并植入到假孕雌性中。获得了6只雄性嵌合体,其中5只显示出超过95%嵌合性。使嵌合体与C57B1/6J雌性杂交,其全部导致种系传递(100%)。使小鼠进一步与C57B1/6回交至少7代。使杂合体雄性和雌性杂交,以产生MCJ纯合体敲除。MCJKO小鼠也与之前描述的OT-I TCR转基因小鼠(Hogquist等,1994Cell 76,17-27)和MMTV-PyMT小鼠(Guy等,1992Mol Cell Biol 12,954-961)杂交。使用的小鼠为10至14周龄。对于饥饿研究,向小鼠提供水但是不提供食物36小时。收获血液、肝脏、肾脏和褐色脂肪。对于肝脏胆固醇积累研究,向小鼠提供高胆固醇食物(Harlan Keklad TD.902221)4周,如参见Plavinskaya,T.等,Pulm Pharmacol Ther.Effects of acute and chronic low density lipoprotein exposure on neutrophil function,Epub 2012,10月17日中所述。所有小鼠以无菌条件安置于佛蒙特大学的动物饲养设施中。所述程序获得了佛蒙特大学动物饲养和使用委员会(University of Vermont Institutional Animal Care and Use Committee)的批准。

[0141] 细胞制备、培养条件、增殖和试剂。

[0142] 如之前的描述(Auphan等,1998JImmunol 160,4810-4821;Conze等,2002J Exp Med 195,811-823)通过阴性选择,以及使用MACS系统根据制造商(Miltenyi Biotcc,Cambridge,MA)推荐通过阳性选择由脾和淋巴结纯化CD8 T细胞和CD4 T细胞。用板结合的抗CD3(2C11)(5μg/ml)和可溶的抗CD28(1μg/mI)(BD Biosciences,Sparks,MD)mAb刺激纯化的T细胞。使用经抗CD3和抗CD28激活并且如之前描述(Conze等,2002J Exp Med 195,811-823)用[^{3}H]-胸苷标记的纯化CD8 T细胞(10^5细胞/孔)进行增殖测定。如之前的描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)培养MCF7、MCF7/siMCJ和293T细胞系。鱼藤酮(以10μM使用)购自Sigma Aldrich(St.Louis,MO)。如之前的描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)通过磷酸钙进行293T细胞的转染。

[0143] Northern印迹分析。

[0144] 人和小鼠多组织Northern印迹(MTN)购自Clontech Laboratories,Inc.(Mountain View,CA),并且包含来自不同组织的归一化的聚A(PolyA)RNA水平。如所描述的(Rincón等,1988Eur J Immunol Nov;18(11):1791-6)进行小鼠和人二者MCJ探针的放射性标记,并且根据制造商说明书进行Northern印迹分析。

[0145] Southern印迹分析。

[0146] 使用经NcoI消化的10μg尾基因组DNA。在琼脂糖凝胶上分离DNA片段,将其转移到Hybond™尼龙膜上,并且用来自MCJ内含子1[5'-gtgggggtgtctgtgaagtagttt-3'(SEQ ID NO:6)和5'-ctgggatttaaggagttcacaa-3'(SEQ ID NO:7)]的PCR扩增区域进行放射性标记探测。

[0147] RNA分离和RT-PCR。

[0148] 使用Qiagen mini **RNeasy®**试剂盒根据制造商(Qiagen,Valencia,CA)的推荐分离总RNA。通过如之前的描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)进行逆转录来获得第一链cDNA。使用cDNA通过常规PCR或实时RT-PCR检测小鼠HPRT、MCJ、β2微球蛋白。对

于实时RT-PCR分析(Applied Biosystems™,Carlsbad,CA),将以下引物/探针设计组用于小鼠MCJ[正向5'-ccg aat acc tgc ctc ctt ctg-3'(SEQ ID NO:8),反向5'-aca cag cgg gga gaa ggt t-3'(SEQ ID NO:9),探针5'-cca aag gtc gga cgc cga cat c-3'(SEQ ID NO:10)]。通过使用次黄嘌呤转磷酸核糖基酶(HPRT)或β_2-微球蛋白作为看家基因比较CT分析确定相对值。使用以下引物进行MCJ的常规RT-PCR扩增[5'-aag taa tca cgg caa cag caa gg-3'(SEQ ID NO:11)和5'-aat aaa agc ctg gca gcc ttg c-3'(SEQ ID NO:12)]。

[0149] Western印迹分析。

[0150] 如之前描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)在triton裂解缓冲液中制备全细胞提取物。使用Cell Fractionation Kit Standard(MitoSciences®,Eugene,OR)纯化CD8T细胞和MCF7细胞的线粒体和细胞溶质提取物,或使用Mitochondrial Fractionation Kit(Active Motif®,Carlsbad,CA)纯化心脏、肿瘤和其他组织的线粒体和细胞溶质提取物。用月桂基麦芽糖苷(1%)或(指定时)洋地黄皂苷(2%)溶解线粒体提取物。如之前描述(参见Da Cruz,S.等,2003J.Biol.Chem.278:41566-41571)使用来自心脏的纯化线粒体提取物对线粒体内膜级分进行分离。如之前描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)进行Western印迹分析。在亲和免疫纯化(Cocalico Biologicals,Inc.™,Reamstown,PA)之后,用小鼠MCJ的N末端肽(35个氨基酸)进行免疫来产生抗小鼠MCJ兔多克隆。已经对抗人MCJ小鼠单克隆Ab进行了描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)。使用的其他抗体是:抗肌动蛋白、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(抗-GAPDH)、抗兔IgG、抗山羊IgG、抗小鼠IgG(Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA)、抗-CoxIV(Cell Signaling Technology®,Danvers,MA)、抗-NDUFA9和抗-NDUFS3(MitoSciences®,Eugene,OR)以及复合体III Core1蛋白(MitoSciences);抗糖原合成酶(Cell Signaling Technology®);抗-磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(抗PEPCK)(Santa Cruz Biotechnology,Dallas,TX);钙网蛋白(Enzo Life Science,Farmingdale,NY);和sintaxin 11(BD Bioscience,San Jose,CA)。使用LumiGLO®化学发光底物系统(KPL,Gaithersburg,MD)观察蛋白质。使用如上述产生的线粒体提取物和复合体I免疫捕获单克隆抗体(MitoSciences®,Eugene,OR)根据制造商(MitoSciences®,Eugene,OR)推荐对复合体I进行免疫沉淀。使用如上述产生并用麦芽糖苷(1%)作为洗涤剂溶解的线粒体提取物和复合体I或复合体III免疫捕获单克隆抗体(Mito Sciences)根据制造商推荐对复合体I和复合体III进行免疫沉淀。然后通过Western印迹检查免疫沉淀物中MCJ的存在,或检查复合体I、III或IV亚单位。然后通过Western印迹分析检查免疫沉淀物中MCJ以及复合体I和III亚单位的存在。

[0151] 流式细胞术分析。

[0152] 使用针对CD4、CD8、Thy 1.1、Thy 1.2、Vα2的即时(directly)标记抗体[BD Biosciences(Sparks,MD)和BioLegend®(San Diego,CA)]进行细胞表面染色。使用UV-蓝(UV-Blue)染料[Molecular Probes®,Inc,Life Technologies,(Beverly,MA)]根据制

造商推荐进行细胞活力染色。用四甲基若丹明、乙酯、高氯酸盐/酯(TMRE)[Molecular Probes®,Inc,Life Technologies,(Beverly,MA)](10μM)根据制造商推荐在37℃染色20分钟来进行线粒体膜电位分析。通过用Mito-SOX™-Red(Invitrogen®,Life Technologies,Beverly,MA)(2.5μM)根据制造商推荐在37℃染色10分钟来进行线粒体ROS分析。使用LSRII流式细胞仪(BD Biosciences,Sparks,MD)和FLOWJO®软件(Flowjo,Ashland,OR)通过流式细胞术分析检查所有样品。

[0153] 通过用针对CD4、CD8和B220(B细胞标志物)的Ab进行染色以及Aria Flow Cell Sorter(BD Biosciences,Sparks,MD)对表达MCJ的外周CD4 T细胞、CD8 T细胞和B细胞进行细胞分选纯化。

[0154] 关聚焦显微镜分析。

[0155] 如之前的描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)对转染的293T细胞进行用于共聚焦显微镜分析的细胞准备和免疫染色。使用Mito Tracker®和TO-PRO®[Molecular Probes®,Life Technologies,(Beverly,MA)]分别作为线粒体和细胞核的标志物。使用抗HA标签Ab(Cell Signaling Technology®,Danvers,MA)检测HA标记的MCJ,然后是抗兔二级Ab[Molecular Probes®,Life Technologies,(Beverly,MA)])。使用Zeiss LSM 510META共聚焦激光扫描成像系统(Carl Zeiss Microimaging,Thornwood,NY)通过共聚焦显微镜检查样品。

[0156] 免疫电子显微镜分析。

[0157] 如之前描述(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966)使用MCJ转染293T细胞、新分离的CD8 T细胞或心脏组织的经固定包埋制备物进行MCJ的免疫电子显微镜分析。使用抗小鼠MCJ兔多克隆Ab检测MCJ。

[0158] 组织学和血清生物化学分析。

[0159] 对于组织学分析,收获肝、肾、褐色脂肪和乳腺肿瘤,固定在福尔马林中并用石蜡包埋。根据常规程序用H&E对来自石蜡包埋块的组织切片进行染色。用具有来自Optronics®(Goleta,CA)的Magnafire®数码相机或具有EVOS®XL Core显微镜(AMG,Life Technologies,Grand Island,NY)的Olympus®BX50光学显微镜获得图像。为了分析肝脏中的脂质积累,将新鲜收获的肝脏冰冻在OCT中并用Oil Red O对冰冻切片染色。对于糖原的组织学分析,对石蜡包埋的肝和肾切片进行过碘酸-希夫(PAS)染色。使用Glucose(HK)测定试剂盒根据制造商(Sigma Aldrich,Saint Louis,MO)推荐测定肝提取物(相当于1mg)中的糖原水平。使用甘油三酯比色试剂盒(Bio Vision,Milpitas,CA)和酮体试剂盒(Cayman Chemicals,Ann Arbor,MI)根据制造商推荐测定血清中甘油三酯的水平。使用游离脂肪酸定量试剂盒(Free Fatty Acidquantification kit,Cayman Chemical®,Ann Arbor,MI)和/或游离脂肪酸定量试剂盒(Bio Vision,Milpitas,California)根据制造商推荐测定血清和肝脏提取物中的游离脂肪酸(FFA)水平。使用

Abeam试剂盒(Abeam,Cambridge,MA)测定肝脏提取物(相当于1mg)中胆固醇的水平。使用葡萄糖监测系统(LifeScan,Milpitas,California)测定血液中的葡萄糖水平。

[0160] 复合体I活性。

[0161] 使用根据纯化复合体I的方案(MitoSciences®,Eugene,OR)产生的线粒体提取物进行复合体I活性的分析。使用来自MitoSciences®(Eugene,OR)的复合体I酶活性微板测定试剂盒并根据制造商推荐进行活性测定。线粒体提取物在样品之间归一化,并且使用总计1μg(心脏)、5-20μg(MCF7和MCF7/siMCJ细胞)或1.8μg(T细胞)进行测定。

[0162] 细胞内ATP水平测定。

[0163] 使用每份样品104个细胞(CD8 T细胞、MCF7细胞和293T细胞)和ATPlite®令光ATP检测分析系统(PerkinElmer®,Waltham,MA)以及TD-20/20光度计(Turner Biosystems,Promega®,Madison,WI)根据制造商推荐测定细胞内ATP水平。为了分析乳腺肿瘤组织中ATP的水平,如上所述产生细胞溶质和线粒体提取物,并使用ATPlite®试剂盒(PerkinElmer®,Waltham,MA)测定量等于10μg之蛋白质的ATP含量。

[0164] 现在已经表明,MCJ停留在线粒体中,在那里其作为线粒体呼吸链的复合体I的负调节物。MCJ的损失导致复合体I活性升高、线粒体超极化以及ATP的产生增加。在不存在MCJ的情况下,增强的线粒体氧化磷酸化作为能量来源在饥饿期间加速脂肪酸氧化,并防止脂质在肝脏中的积累。另外,MCJ缺陷还延缓乳腺肿瘤的生长,这与不能减弱线粒体功能相关。因此,MCJ是线粒体代谢的必要负调节物。

[0165] 结果

[0166] 小鼠MCJ/DnaJC15的鉴定揭示了与人直接同源物保守的组织表达模式。

[0167] 之前已经在人卵巢和乳腺癌细胞中检查了MCJ/DnaJC15表达(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966;Lindsey等,2005IntJ.Cancer Jan 15;118(2):346-52.;Shridhar等,2001Cancer Res61,4258-4265;Strathde等,2004Carcinogenesis 25,693-701)。之前报道MCJ起源于脊椎动物,在脊椎动物中,其高度保守(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966),但是没有研究报道其小鼠中对应物。人和小鼠MCJ蛋白质序列的比较分析表现出整体75%的同一性(图1A),具有几乎相同的跨膜和C末端DnaJ结构域区,以及高度保守(57%)的N末端区(1-35位氨基酸)。为了鉴定小鼠MCJ基因的组织表达模式,使用上述方法进行Northern印迹分析。MCJ mRNA在心脏中高度丰富,然后是肝和肾(图1B)。尽管MCJ在一些人癌细胞中表达,但是正常人组织中MCJ表达的特定分布依然未知。非恶性人组织的Northern印迹分析表明人mcj基因表达的分布与小鼠mcj基因类似(图1C)。之前使用CD8 T细胞进行的微阵列分析表明MCJ还存在于这种免疫细胞类型中(数据未示出)。为了进一步研究免疫系统不同群体中MCJ的表达,由小鼠脾和淋巴结分离CD4和CD8 T细胞以及B细胞,并进行实时逆转录酶(RT)PCR。有趣的是,mcj基因在CD8 T细胞中的表达非常高,但是在CD4 T细胞和B细胞中几乎不可检测(图1D)。

[0168] 产生了特异性识别小鼠MCJ的N末端区域的抗体(Ab),如通过小鼠MCJ转染之293T细胞的Western印迹分析确认的(图1E)。使用这种Ab通过Western印迹分析检查小鼠组织中

内源MCJ蛋白的表达。与mRNA表达分析一致，MCJ蛋白存在于心脏、肝和肾中，但在肺中几乎不可检测(图1F)。MCJ蛋白在CD8 T细胞中也很丰富，但是在CD4 T细胞中含量低(图1G)。因此，鉴定出MCJ/DnaJC15具有受限的组织和细胞分布。

[0169] MCJ/DnaJC15是新的线粒体停留关伴侣分子。

[0170] 系统发育分析已表明MCJ的祖先是存在于酵母中的Tim14(Mokranjac等，2003EmboJ 22，4945-4956)。Tim14定位于线粒体内膜中，是TIM23移位酶的组分(Mokranjac等，2005J Biol Chem 280，31608-31614)。之前已经报道，基于293T细胞(不表达内源MCJ)中MCJ的过表达分析以及使用共聚焦显微镜的Mito Tracker®染色，MCJ并不定位于线粒体中(Hatle等，2007Mol Cell Biol 27，2952-2966)。另外，在转染的293T细胞中，通过免疫电子显微镜(IEM)在界限明确的线粒体中未发现MCJ免疫染色，但是在其他电子致密的不典型囊泡/细胞器中观察到了MCJ免疫反应性(Hatle等，2007Mol Cell Biol 27，2952-2966)。为了更精确地剖析MCJ在正常组织中的潜在功能，在生理条件下通过IEM检查内源MCJ在心脏中的定位。大部分MCJ免疫反应性发现于清楚限定的线粒体中，主要在内膜上(图2A)。还通过IEM检查了纯化的CD8 T细胞中MCJ的表达。结果表明MCJ几乎仅定位于CD8 T细胞的线粒体(图2B)。在过表达MCJ(24小时)的293T细胞中通过IEM对MCJ进行的更详细的分析表明了MCJ免疫反应性存在于不典型的细胞器中，其可能是已失去其内膜形成的脊并经受了降解的未定界的溶胀线粒体中(图2C)。在转染有MCJ的293T细胞(24h)中，MCJ和Mito Tracker®的共聚焦显微镜分析表明Mito Tracker®染色限定了未经转染细胞中的线粒体，而在MCJ过表达细胞中线粒体染色几乎不可检测(图2D-F)。因此，在生理条件下发现MCJ定位于线粒体，但是在该细胞器中持久的过表达导致明显的形态损伤。

[0171] 为了进一步证明内源MCJ的线粒体定位，在小鼠心脏线粒体和细胞溶质级分中进行MCJ的Western印迹分析。在线粒体级分中发现了高水平的MCJ，而在细胞溶质级分中几乎不可检测(图2G)。通过作为线粒体标志物的呼吸链复合体IV(CoxIV)以及作为细胞溶质级分的标志物的GAPDH的表达来测定级分的纯度(图2G)。MCJ还几乎仅存在于纯化CD8 T细胞的线粒体级分中(图2H)。在细胞核级分中未检测到MCJ(数据未示出)。另外，乳腺癌MCF7细胞系中内源人MCJ的Western印迹分析也表明MCJ主要存在于线粒体中(图2I)。因此，内源MCJ优先定位于线粒体中，并且在线粒体内，其似乎锚定在内膜的嵴上。

[0172] MCJ作为线粒体膜电位和ATP产生的负调节物的功能。

[0173] 线粒体的主要功能是通过氧化磷酸化为细胞提供ATP作为能量来源。除了转移电子外，线粒体电子转移链(ETC)的复合体I、III和IV还通过促进H+从线粒体基质向膜间隙的跨膜转运而有助于线粒体膜电位(MMP)的建立。复合体V(ATP合成酶)使用H+流回到线粒体基质中所产生的能量来产生ATP。为了确定MCJ是否可调节线粒体功能，将已知表达MCJ的MCF7乳腺癌细胞(Hatle等，2007Mol Cell Biol 27，2952-2966)中的ATP水平与MCF7/siMCJ细胞中的水平进行比较，MCF7/siMCJ细胞是通过MCJ shRNA敲减了MCJ表达的MCF7细胞(Hatle等，2007Mol Cell Biol 27，2952-2966)。有趣的是，MCF7/siMCJ细胞中ATP的水平显著高于MCF7细胞中(图3A)。MCF7/siMCJ细胞中升高的ATP量主要来源于线粒体，因为鱼藤酮对ETC复合体I的抑制降低了ATP水平(图3B)。这些结果表明，MCJ是线粒体ATP合成的负调节物。为了进一步确认这些结果，在表达MCJ后检查293T细胞中ATP的水平。293T细胞仅转染16

小时以避免24小时后观察到的线粒体损伤(图2)。在表达MCJ的细胞中,ATP水平相对于质粒对照细胞极大降低(图3C),进一步证明了MCJ对ATP产生的负调控。

[0174] 由于MCJ定位于线粒体内膜中,研究了MCJ是否可损害MMP作为限制线粒体ATP合成的机制。用MCJ或对照质粒转染(16小时)293T细胞,通过TMRE染色和流式细胞分析检查MMP。如通过较低的TMRE强度(图3D)确定的,MCJ的表达明显地使线粒体去极化,表明MCJ表达可消耗MMP。持久的线粒体去极化可能造成线粒损伤,如在转染更长时间段的293T细胞中观察到的(图2)。由于与CD4 T细胞相比,MCJ在CD8T细胞中的表达丰富,还分析了从野生型小鼠中新鲜分离的这两种细胞类型之间MMP的差异。有趣地,与MCJ在CD8 T细胞中的选择性存在相关,与CD4 T细胞中的线粒体相比,大部分CD8 T细胞中的线粒体被去极化(图3E)。由于电子主要从复合体III逃逸,ETC还可有助于产生线粒体活性氧物质(mitochondrial reactive oxygen species,mROS)(Hamanaka和Chandel,2010Trends Biochem Sci 35,505-513)。与MMP不同,通过用MitoSox®-Red染色以及流式细胞术对线粒体ROS(mROS)进行的分析表明CD4和CD8 T细胞之间mROS水平没有差异(图3F)。为了进一步剖析MCJ在线粒体功能中的作用并确定CD8 T细胞的去极化状态是否是由MCJ的存在引起的,产生了MCJ缺陷小鼠。

[0175] 通过Southern印迹分析确认MCJ缺陷小鼠的基因型(图4A)。为了确证MCJ表达的损失,通过Western印迹分析检查不同组织中内源MCJ蛋白的水平。在来自野生型小鼠的心脏和肝中检出了MCJ,但是在MCT敲除(KO)小鼠中未检测到(图4B)。在来自MCJ KO小鼠的CD8 T细胞中MCJ的表达同样被消除(图4B)。在来自野生型或MCJ KO小鼠的CD4 T细胞中均未能检测到MCJ(图4B)。另外,MCJ靶向的小鼠中,未能检测到MCJ mRNA,确证了MCJ表达的损失(图4C)。与野生型CD8 T细胞相比,杂合体小鼠中的MCJ mRNA的水平同样被降低(图4C),表明CD8 T细胞的MCT表达依赖于等位基因拷贝数。MCJ表达的中断不影响小鼠的生存能力,一直到检验年龄(约1年)。雄性和雌性MCJ缺陷小鼠二者均可育,并且未表现出任何明显的畸形或行为异常(数据未示出)。因此,在生理条件下,MCJ对于发育和/或正常器官功能不是必需的。为了证明MCJ有助于维持线粒体的去极化状态,检查分离自野生型和MCJ KO小鼠的CD8 T细胞中的MMP。相对于野生型CD8 T细胞,来自MCJ KO小鼠的CD8 T细胞被超极化至比得上野生型CD4 T细胞的水平(图3G)。在野生型和MCJ KO CD8 T细胞之间,未观察到mROS的差异(图3H)。不出所料,对来自野生型和MCJ KO小鼠的CD4 T细胞的分析未表现出MMP(图3I)或mROS(图3J)的差异,与MCJ在CD4 T细胞中低表达一致。

[0176] 总之,结果证明,MCJ是线粒体电子传递链的负调节物,MCJ的存在用以维持线粒体的去极化状态,并且限制线粒体产生ATP。因此,MCJ的损失导致线粒体超极化。

[0177] MCJ在效应CD8 T细胞的消退阶段(contraction phase)减弱线粒体代谢。

[0178] 检查了相对于野生型CD8 T细胞,MCJ KO CD8 T细胞中线粒体的超极化是否影响其发育。在MCJ敲除小鼠中,淋巴结(图5A)和脾(数据未示出)中CD8 T细胞的百分比和数目未受影响。相似地,在MCT KO小鼠中也未在胸腺细胞群中观察到差异(数据未示出)。因此,MCJ对于外周免疫系统中CD8 T细胞发育或内稳态似乎不是必不可少的。还检查了MCJ的损失对于CD8 T细胞的增殖反应可能具有的影响。用抗CD3和抗CD28抗体激活纯化的CD8 T细胞。通过引入[^{3}H]-胸苷来测量增殖。在MCJ KO和对照野生型小鼠之间,没有观察到CD8 T细胞增殖反应中的显著差异(图6A)。另外,尽管线粒体中存在MCJ,但是在激活期间来自MCJ缺

陷小鼠的CD8 T细胞并不经历更迅速的细胞死亡(图5B)。激活期间野生型和MCJ KO CD8 T细胞之间活化标志物(例如,CD69、CD44、CD25)的表达也是相当的(数据未示出)。因此,MCJ对于CD8 T细胞的活化或克隆扩增似乎是不必需的。进一步检查了在用抗CD3和抗CD28 Ab激活CD8 T细胞期间MMP的调节。在野生型CD8 T细胞中,活化期间MMP逐渐增多(图6B)。虽然在MCJ KO CD8 T细胞和野生型CD4 T细胞中MMP也随着活化稍微增多,但是由于在活化前已经是高度超极化阶段,影响不太明显(图6B)。2天后,野生型CD8 T细胞中的MMP水平达到了与活化的MCJ KO CD8 T细胞和野生型CD4 T细胞中类似的水平(图4B)。活化两天后,野生型和MCJ KO CD8 T细胞之间的mROS水平也相差不多(图7)。

[0179] 在免疫应答的消退阶段,大部分效应CD8 T细胞死亡,但是最终存活变成记忆细胞的那些细胞经历了改变,以使其代谢恢复至在非活化幼稚CD8 T细胞中发现的基础水平。检查了在CD8 T细胞从效应阶段向休眠阶段过渡期间的MMP调节。在用抗CD3和抗CD28 Ab活化两天后,洗涤野生型和MCJ KO CD8 T细胞,并单独在培养基中孵育24小时或48小时。24小时后,野生型和MCJ KO CD8 T细胞二者均保持超极化,但是在MCJ KO CD8 T细胞中MMP保持为略微更高(图6C)。但是,有趣的是,在48小时后,很大一部分野生型CD8 T细胞已经去极化至在幼稚CD8 T细胞中发现的水平,但是大部分MCJ KO CD8 T保持超极化(图6C)。因此,发现MCJ是效应CD8 T细胞的休眠阶段以及在MMP恢复至存在于幼稚细胞中的低水平的过程中线粒体去极化所必需的。mROS的水平也随着时间降低,但是在野生型和MCJ KO CD8 T细胞之间没有显著差异(图6D)。还观察到,尽管在休眠时期野生型CD8 T细胞的大小降低到了与幼稚细胞相差无几的大小,但是MCJ KO CD8 T细胞保持为较大(数据未示出),表明MCJ缺陷诱导的持续线粒体代谢导致持续活跃的细胞代谢。为了支持这种持续的活跃代谢,在休眠时期,MCJ缺陷的CD8 T细胞中保持比野生型CD8 T细胞高的ATP水平(图6E)。为了在体外确定MCJ缺陷对于代谢的影响是否影响细胞存活,测量肝细胞的恢复。在体外2天休眠时期后,发现野生型CD8 T细胞存活的极少,而几乎100%的MCJ KO CD8 T细胞保持存活(图6F),表明MCJ有助于活化时CD8 T细胞群的消退。

[0180] 为了在体内进一步研究效应阶段向休眠阶段过渡期间MCJ在抗原特异性CD8 T细胞的代谢中的作用,使MCJ KO小鼠与表达识别卵白蛋白之TCR的OT-I TCR转基因小鼠(Hogquist等,1994Cell 76,17-27)杂交,产生单克隆T细胞群。对由野生型和MCJ KO纯化的OT-I CD8 T细胞进行活化和体外扩增。将等量的每一种类型细胞混合并共转移到野生型宿主小鼠中。15天后,使用Thy 1.1和Thy 1.2标志物通过流式细胞术分析检查来自宿主小鼠的淋巴结和脾中供体细胞的存在,并且通过尺寸散射(size scatter)确定细胞大小。虽然两种供体回收的百分比相差无几(数据未示出),但是如所预期的,大部分野生型供体OT-1CD8 T细胞(Thy 1.1+)较小,而大部分MCJ KO OT-1 CD8 T细胞(Thy1.1+Thy1.2+)展示出大尺寸(图6G)。因此,结果表明MCJ缺陷导致在不存在抗原的情况下体内效应CD8 T细胞延长的活化代谢阶段,表明MCJ有助于CD8 T细胞在从效应阶段向休眠阶段过渡期间减弱线粒体代谢。

[0181] 通过MCJ损失增强线粒体代谢阻止了饥饿期间的肝脂肪变性。

[0182] MCJ减弱线粒体代谢的作用与基础(生理)条件下MCJ缺陷小鼠中异常表型的缺少有关。但是,与效应CD8 T细胞的休眠阶段的诱导类似,MCJ缺陷可能会影响代谢平衡被破坏的状态。禁食造成剧烈的代谢改变,因为缺少足够的葡萄糖会引发储存在脂肪组织中的甘

油三酯水解成游离脂肪酸(FFA)，游离脂肪酸然后被调动到血浆中并运输到肝。在肝中，FFA进入线粒体β氧化并被用作能源。由于MCJ在肝中高表达，假设在缺乏MCJ的情况下提高/保持的线粒体代谢可加速FFA的β氧化并最小化其在肝中的积累。还检查了MCJ在禁食代谢中的作用。正常(进食)条件下肝的组织学分析表明野生型和MCJ缺陷小鼠之间没有可检测差异(图8A)。禁食36小时的野生型小鼠的肝中表现出明显的脂肪变性迹象，如通过富含液泡之细胞的存在所确定的(图8A)。相比之下，在来自禁食MCJ KO小鼠的肝脏中检测到了最小化的脂肪变性迹象(图8A)。对通过Oil Red O染色的肝冰冻切片中脂质积累的分析进一步确证了在禁食的野生型小鼠中存在大量脂质，而MCJ KO小鼠肝中以低水平存在(图8B)。这些结果表明MCJ KO小鼠中FFA的持续线粒体氧化最小化了脂质在肝脏中的积累。还检查了血清甘油三酯和FFA水平。与野生型小鼠相比，禁食MCJ KO小鼠中甘油三酯(图8C)和FFA(图8D)二者的水平均降低，进一步证明了存在储存脂质的加速消耗。同样地，在禁食MCJ KO小鼠中观察到保留了最少的白色脂肪量(数据未示出)。另外，尽管正常条件(进食)(图9A和9B)下未发现野生型和MCJ KO小鼠之间褐色脂肪的明显差异，但是禁食后褐色脂肪的全量分析(图10A)和组织学分析(图10B)揭示在MCJ KO小鼠中其几乎完全不存在。因此，作为线粒体功能的负调节物，该结果表明MCJ在禁食期间具有调节代谢的作用。

[0183] MCJ损失阻止了响应于代谢改变的肝中脂质积累和脂肪变性。

[0184] 尽管鉴定了禁食期间小鼠中代谢加速，但是MCJ KO小鼠中禁食导致的体重减轻与野生型小鼠中的体重减轻之间没有统计学差异(图11A)；甚至在两个组中初始重量相差无几(图11B)。另外，禁食期间血液中葡萄糖水平的分析表明，MCJ KO和野生型小鼠之间没有统计学显著差异，无论是葡萄糖初始降低期间(12小时)(图11C)还是恢复期间(图11D)。这些结果表明存在平衡无MCJ时肝中加速的脂质代谢的机制。通过线粒体对肝中游离脂肪酸(FFA)的β氧化增加可导致脂质分解产生的ATP(通过β氧化)和甘油的水平增加。ATP和甘油的积累可作为信号被肝脏觉察，开始糖原生成(能量消耗过程)以储存过多的能量。在禁食后对肝脏中的ATP水平进行分析，确证了相对于野生型小鼠的肝脏，MCJ KO小鼠肝脏中ATP的水平提高(图11E)。通过PAS染色检查肝脏中的糖原水平。如预期的，在禁食的野生型小鼠中，肝脏中的糖原几乎不可检测(图11F)。但是，禁食MCJ KO小鼠的肝脏中糖原以高水平积累(图11F)。除了肝脏外，在肾脏的皮质中也可发生较低程度的糖原生成。通过PAS染色，还在禁食MCJ KO小鼠肾脏的一些区域中发现了糖原的积累。肝提取物中糖原的生化分析进一步证明了禁食MCJ KO小鼠中糖原的选择性积累(图11G)。在未禁食野生型小鼠和未禁食MCJ KO小鼠中，未发现肝脏中糖原基础水平之间的差异(图11G)。禁食MCJ KO小鼠的肝脏中糖原而非脂质的积累与相对于野生型小鼠肝脏占体重的增加比相关(图11H)。糖原是使用UDP葡萄糖作为底物通过糖原合成酶合成的。相对于野生型小鼠，禁食MCJ KO小鼠的肝脏中的糖原合成酶水平上调(图11I)。相比之下，禁食的WT和MCJ KO小鼠中磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)的水平相差不大(图11I)，表明MCJ KO小鼠肝脏中存在的糖原可能是由甘油三酯水解产生的葡萄糖产生的，磷酸烯醇丙酮酸羧激酶是由丙酮酸合成葡萄糖的过程中必不可少的糖异生酶。

[0185] 根据其在线粒体呼吸中的负作用，这些结果表明MCJ是禁食期间肝代谢的重要调节物，MCJ的缺失有助于脂质降解和肝脏中的糖原生成。为了研究MCJ是否还有可能在响应于其他改变的饮食条件的调节机制中具有作用，还研究了其响应于高胆固醇饮食的作用。

高胆固醇是全世界主要的健康问题。用高胆固醇饮食喂养野生型和MCJ KO小鼠4周[参见Plavinskaya,T.等,Pulm Pharmacol Ther.2013Aug;26(4):405-11.doi:10.1016/j.pupt.2012.10.002.Epub 2012 Oct 17;Teratani,T.等,Gastroenterology.2012Jan;142(1):152-164(Epub 2011Oct 10)]。在用高胆固醇饮食喂养的野生型小鼠的肝脏中,积累了高水平的胆固醇(图11J)。在用正常饮食喂养的野生型和MCJ KO小鼠的肝脏中,存在类似的低的胆固醇水平(图11K)。因此,结果表明MCJ调节多种代谢疾病所造成的影响。

[0186] MCJ缺陷延缓肿瘤生长。

[0187] 虽然线粒体呼吸是产生ATP的最有效机制,但是在一些情况下,细胞选择糖酵解,尽管其效率较低。因此,癌细胞通过糖酵解而非通过线粒体氧化来产生其ATP,即使是在有助于肿瘤生长的需氧条件下也是如此。这种现象被称为Warburg效应,其似乎是癌细胞由于受损的线粒体氧化磷酸化而进行的代谢适应(Cairns等,2011Nat Rev Cancer 11,85-95;Koppenol等,2011Nat Rev Cancer 11,325-337;Warburg,1956JMol Biol 272,477-483)。由于MCJ是MMP和ATP的负调节物,对体内的MCJ缺陷是否会影响肿瘤进展进行了研究。在来自MMTVPyMT转基因小鼠的肿瘤中检查了MCJ表达,其中在MMTV(Mouse Mammary Tumor Virus,小鼠乳腺肿瘤病毒)启动子/增强子的控制下表达多瘤病毒的中间T(MT)抗原,所述启动子/增强子在乳腺上皮细胞中特异性驱动表达(Guy等,1992Mol Cell Biol 12,954-961)。MCJ在正常乳腺和乳腺肿瘤二者中均表达,但是肿瘤中水平显示出略微更高(图12A)。通过Western印迹分析对MMTV-PyMT肿瘤中MCJ细胞定位的分析进一步证实了乳腺肿瘤中MCJ的线粒体定位(图12B)。对来自正常乳腺和乳腺肿瘤的线粒体提取物中MCJ的分析也证实,与正常乳腺线粒体相比,来自肿瘤的线粒体中MCJ的表达提高(图12C)。使MCJ KO小鼠与MMTV-PyMT小鼠杂交,然后进行乳腺肿瘤发生。有趣的是,尽管MMTV-PyMT/MCJ KO小鼠发生了肿瘤,但是与MMTV-PyMT幼崽相比其动力学被延迟。与之前的研究一致(Guy等,1992Mol Cell Biol 12,954-961),在MMTV-PyMT幼崽中,10-12周龄为止可清楚检测到肿瘤,但是在MMTV-PyMT/MCJ KO小鼠中,在18-20周之前一直没有明显的肿瘤可感知。在由于肿瘤尺寸太大而不得不对小鼠进行安乐死时,使用此时的小鼠年龄建立存活曲线。与MMTV-PyMT小鼠相比,MMTV-PyMT/MCJKO小鼠中肿瘤的生长显示出明显延迟(图12D)。组织学分析表明,在MMTV-PyMT和MMTV-PyMT/MCJ KO小鼠的类似大小的肿瘤之间没有明显差异(图12E)。为了研究肿瘤生长的延迟是否与作为能量来源的线粒体呼吸相对于细胞溶质糖酵解之平衡的改变有关,检验产生自野生型和MCJ KO肿瘤的细胞溶质和线粒体提取物中的ATP水平。与来自野生型小鼠的肿瘤中的比例相比,来自MCJ KO小鼠的肿瘤中线粒体/细胞溶质ATP水平的相对比例明显提高(图12F)。因此,MCJ缺失时所发现的增强的线粒体代谢与减弱的乳腺肿瘤生长有关。

[0188] MCJ是线粒体电子传递链中复合体I的内源抑制剂。

[0189] 为了研究MCJ能够调节线粒体膜电位的分子基质并发现潜在的相关蛋白,使用MCJ的N末端区域作为诱饵进行噬菌体展示筛选。筛选的结果揭示了线粒体ETC内复合体I的一个亚基(NDUFv1)为与MCJ潜在相互作用的蛋白质(数据未示出)。哺乳动物复合体I(NADH泛醌氧化还原酶)包含49个已鉴别亚基、黄素单核苷酸(FMN)基团和8个Fe-S簇(Clason等,2009JStruct Biol 169,81-88)。尽管MCJ未被描述为复合体I的实际亚基,但是可能的是MCJ可与复合体I相互作用并调节其活性。为了确定MCJ是否与复合体I缔合,从野生型和MCJ

KO小鼠的心脏线粒体提取物免疫沉淀复合体I。通过Western印迹分析检查免疫沉淀物中MCJ的存在。在来自野生型小鼠的复合体I免疫沉淀物中，存在对应于MCJ的分子量的条带，而在来自MCJ KO小鼠中不存在(图13A)。作为免疫沉淀的对照，还检查了两种良好表征的复合体I亚基NDUFA9和NDUFS3的表达(图13A)。因此，MCJ与线粒体复合体I缔合。

[0190] 为了确定MCJ是否可能是复合体I的调节物，检查来自野生型和MCJ缺陷小鼠的心脏线粒体提取物中复合体I的活性。与野生型心脏相比，MCJ缺陷心脏中检测到了较高的复合体I活性(图13B)。但是，MCJ缺陷不影响线粒体中复合体I的总量，如通过Western印迹分析对于NDUFA9所测定的(图13C)。相对于CD4 T细胞，MCJ在CD8 T细胞中的选择性存在也表明了这两种细胞类型之间复合体I活性的潜在差异。对由新鲜分离的CD8和CD4 T细胞获得的线粒体提取物中复合体I活性的分析确实表明CD8 T细胞中复合体I的活性显著更低(图13D)。在CD4和CD8 T细胞之间，线粒体提取物中NDUFA9和NDUFS3的水平相当(图13E)。更重要的是，与野生型CD8 T细胞相比，对MCJ KO CD8 T细胞中复合体I活性的分析表明复合体的活性升高(图13D)。在野生型和MCJ KO CD8 T细胞之间，未能检测到线粒体中NDUFA9或NDUFS3的水平差异(图13E)。因此，相对于CD4 T细胞，CD8 T细胞中复合体I的失活和线粒体的去极化是通过CD8 T细胞中存在的MCJ介导的。还在人MCF7细胞中检查了MCJ缺陷对于复合体I活性的影响。尽管两种细胞类型中线粒体中复合体I的水平相当(图13F)，但是与MCF7细胞相比，MCF7/siMCJ细胞(缺少MCJ)中存在更高的复合体I活性水平(图13G)。总之，这些结果表明MCJ是线粒体中呼吸链复合体I的内源负调节物。

[0191] 本文所述研究揭示了MCJ/DnaJC15共伴侣分子作为复合体I的负调节物的新作用。这是迄今首次表明MCJ/DnaJC15具有减弱线粒体代谢的作用，并且MCJ的损失改变不同组织中的体内代谢切换。因此MCJ可作为调节细胞中的能量平衡的靶标。

[0192] 如上文已经部分概括的，现已经表明MCJ与复合体I以物理方式缔合。MCJ与复合体I的缔合可能是动态的，并且可能是一种在需要降低线粒体代谢活性的情况下(例如，饥饿、压力等)快速调节线粒体呼吸的机制。复合体I的这种失活机制可能在线粒体在作为能量来源方面发挥重要作用的那些组织(例如，心脏)中具有作用。

[0193] 与MCJ对复合体I活性的抑制作用一致，现在已经证明MCJ的缺失导致线粒体膜电位升高和ATP水平增加。线粒体代谢的相对升高在生理条件下可能不具有明显作用。在这一点上，在生理条件下，MCJ缺陷小鼠不表现出改变的表型。但是，在压力/病理情况下，没有MCJ的情况下增强线粒体代谢可能影响代谢切换，并影响正常响应的过程。通过本文给出的实验，现已经证明MCJ缺陷在禁食条件下改变代谢，并且其降低脂质在肝脏中的积累并防止脂肪变性。

[0194] 尽管不希望受到任何特定机制的约束，减少肝脏中脂质的积累和防止脂肪变性可通过增强脂质β氧化而实现。与加速的脂类分解相关，在禁食后观察到MCJ缺陷小鼠中白色脂肪的含量减少，并且仅剩余褐色脂肪。因此，在禁食的初始阶段，MCJ损失引起的增强的线粒体代谢可能有益。但是，由于可利用“燃料”的快速消耗，认为在没有MCJ的情况下较长的禁食时间段可能非常不利。在进化上，脊椎动物中MCJ的获得可能是一种响应于不足的食物摄取而通过抑制复合体I的活性减慢线粒体呼吸和延长脂质储能的一种适应现象。

[0195] 代谢也成为了可能影响T细胞存活和/或功能的重要因素。脂肪酸的氧化和代谢速率影响记忆CD8 T细胞的存活(Araki等，2009Nature 460，108-112；Maines等，2009Science

325,484-487;Finlay和Cantrell,2010Nat Rev Immunol 11,109-117)。另外,最近的研究已经表明,记忆CD8 T细胞的周知的存活因子IL-15通过增强线粒体生物发生促进记忆细胞中的线粒体氧化代谢和ATP产生(van der Windt等,2012Immunity 36,68-78)。提高线粒体脂肪酸氧化与记忆CD8 T细胞提高的存活和功能有关。这里我们表明MCJ有助于复合体I的失活,并因此促进CD8 T细胞中线粒体的去极化。更重要的,现已经表明效应CD8 T细胞休眠期间MCJ的不存在在体外和体内维持了这些细胞中活跃的线粒体代谢。因此,MCJ还可调节记忆CD8 T细胞功能。历史上已经认识到了在活化之前CD4和CD8 T细胞彼此非常类似。本文提出的研究首次示出相对于CD4 T细胞,MCJ在CD8 T细胞中优势表达,并且在这些细胞中,CD8 T细胞中剧烈的线粒体去极化通过MCJ的存在得以保持。这些揭示性发现证明了CD4和CD8 T细胞之间在线粒体代谢方面的明显差异。

[0196] 尽管在生理条件下大部分细胞使用线粒体呼吸作为产生ATP的机制,但是肿瘤细胞切换到糖酵解作为获得ATP的机制,尽管其效率低下,这种现象被称为Warburg效应。Warburg假设癌细胞中代谢切换到糖酵解可能是由于线粒体呼吸受损,但是实际机制依然不清楚。近年来,已经根据来自基础和临床研究的结果对Warburg效应进行了广泛的重新思考(Cairns等,2011Nat Rev Cancer 11,85-95;Koppenol等,2011Nat Rev Cancer 11,325-337;Levine和Puzio-Kuter,2010Science 330,1340-1344)。因此,虽然增强或延长的线粒体呼吸可能对于许多细胞有益,但是其也可能干扰肿瘤生长。在这里,现在表明MCJ缺陷延迟体内乳腺肿瘤生长,其与倾向线粒体呼吸作为能量来源的调整平衡有关。若干体外和/或异种移植研究已经阐明了共伴侣分子(例如,Tid1、MRJ、HLAJ1)在癌症中的作用,并通过干扰细胞侵袭、迁移和/或转移而具有了主要的肿瘤抑制功能(Sterrenberg等,2011Cancer Lett 312,129-142)。这些共伴侣分子均与肿瘤细胞中代谢状态的改变无关。本文描述的工作包括揭示了体内共伴侣分子由于代谢状态的改变而影响肿瘤进展的首次研究。之前已经表明MCJ的损失与乳腺癌和卵巢癌(Hatle等,2007Mol Cell Biol 27,2952-2966;Strathdee等,2005Gynecol Oncol 97,898-903)中的化学抵抗有关。基于本文描述的发现,似乎可能的是在没有MCJ的情况下增强的复合体I活性和线粒体代谢也可能赋予对特定癌症药物的抵抗。

[0197] 虽然本文已经描述和说明了本发明的多个实施方案,但是本领域普通技术人员将容易想到用于实施本文所述功能和/或获得所述结果和/或一个或更多个优点的各种其他手段和/或结构,并且每一个这样的变化和/或修改均被认为包括在本发明的范围内。更普遍地,本领域技术人员将容易理解,本文描述的所有参数、尺寸、材料和构型均意在示例,实际参数、尺寸、材料和/或构型将取决于本发明教导所使用的特定应用。本领域技术人员将认识或者能够仅利用常规实验就能确定针对本文描述的具体发明实施方案的许多等效方案。因此,应理解,前述实施方案仅以示例的方式呈现,并且在所附权利要求及其等同方案的范围内;本发明可以以不同于具体描述并且要求保护的方式来实现。本发明涉及本文描述的每个单独特征、系统、制品、材料和/或方法。另外,如果这些特征、系统、制品、材料和/或方法没有互相矛盾,则两种或更多种的这些特征、系统、制品、材料和/或方法的任意组合也包括在本公开的发明范围内。

[0198] 本文限定和使用的所有定义应理解为优先于其在字典中的定义、通过引用并入的文献中的定义和/或所限定术语的通常含义。

[0199] 本说明书和权利要求中，未用数量词限制的名词应理解为“至少一个/种”，除非明确提到相反情况。

[0200] 本文在说明书和权利要求中使用的短语“和/或”应理解为所连接要素的“任一个或两个”，即，在一些情况下要素同时存在，在另一些情况单独存在。除了“和/或”条款明确提到的要素外，还可能任选地存在其他要素，无论其与这些明确提到的要素相关还是不相关，除非明确提到相反情况。

[0201] 本申请中引用或参考的所有参考文献、专利和专利申请以及公开均通过引用整体并入本文。

序列表

<110> 佛蒙特大学及州农业学院
Rincon, Mercedes
Hatle, Ketki
<120> 用于代谢调节的方法和组合物
<130> UVM70114WO
<150> US 61/670345
<151> 2012-07-11
<160> 12
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 150
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 1

```
Met Ala Ala Arg Gly Val Ile Ala Pro Val Gly Glu Ser Leu Arg Tyr
1               5                  10                  15
Ala Glu Tyr Leu Gln Pro Ser Ala Lys Arg Pro Asp Ala Asp Val Asp
            20                  25                  30
Gln Gln Gly Leu Val Arg Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Gly Val Ala
        35                  40                  45
Ala Leu Ala Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Phe Arg Ile Trp Lys Pro Leu
    50                  55                  60
Glu Gln Val Ile Thr Glu Thr Ala Lys Lys Ile Ser Thr Pro Ser Phe
65                  70                  75                  80
Ser Ser Tyr Tyr Lys Gly Gly Phe Glu Gln Lys Met Ser Arg Arg Glu
                85                  90                  95
Ala Gly Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Gly Lys Ala Lys Ile
            100                 105                 110
Arg Thr Ala His Arg Arg Val Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys Gly
        115                 120                 125
Gly Ser Pro Tyr Val Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu Leu
    130                 135                 140
Glu Thr Thr Thr Lys His
145                 150
```

<210> 2
<211> 1074
<212> DNA

<213> 智人
<220>
<221> misc_feature
<223> 智人含DNAJ结构域之蛋白质MCJ (MCJ) mRNA,
全cds
<400> 2

ggtcaggaaa gctcaggcaa gcccaccctc aggcattaca gctagactcc gagcttactg 60
ggcagtcatc tgattcgacc aacatcagtt cgcagggctt aagcccagtc ccttacggcg 120
gctggggagg gaccaggccc aagtatataa agctccctga gggtccgcgt tggctttgcg 180
cctgtgagtg tgattcaaga acgtcccagt gcccttggct cctttcggag tgtgaccccg 240
tgcttgcacg ggacacgtta cccagctcgg gtgagaaggg tatcttccgg gaacctcgcc 300
tttaatagca caacgagcgc agagtccact ggatctgcga gaagaaaccg cgctaactag 360
tttgtcccta cggccgcctc gtagtcactg ccgcggcgcc ttgagtctcc gggccgcctt 420
gccatggctg cccgtggtgt catcgctcca gttggcgaga gtttgcgcta cgctgagtac 480
ttgcagccct cggccaaacg gccagacgcc gacgtcgacc agcagggact ggtaagaagt 540
ttgatagctg taggactggg tgttgcagct cttgcatttg caggtcgcta cgcatttcgg 600
atctggaaac ctctagaaca agttatcaca gaaactgcaa agaagatttc aactcctagc 660
ttttcatcct actataaagg aggatttgaa cagaaaatga gtaggcgaga agctggtctt 720
attttaggtg taagcccatc tgctggcaag gctaagatta gaacagctca taggagagtc 780
atgattttga atcacccaga taaaggtgga tctccttacg tagcagccaa aataaatgaa 840
gcaaaagact tgctagaaac aaccaccaaa cattgatgct taaggaccac actgaaggaa 900
aaaaaaagag gggacttcga aaaaaaaaaa agccctgcaa aatattctaa aacatggtct 960
tcttaatttt ctatatggat tgaccacagt cttatcttcc accattaagc tgtataacaa 1020
taaaatgtta atagtcttgc tttttattat cttttaaaga tctccttaaa ttct 1074

<210> 3
<211> 149
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus muscula)
<400> 3

Met Ala Thr Gly Gly Gly Val Thr Ser Arg Glu Ser Leu Arg Tyr Ala
1 5 10 15
Glu Tyr Leu Pro Pro Ser Ala Gln Arg Ser Asp Ala Asp Ile Asp His
20 25 30
Thr Ala Gly Arg Arg Leu Ile Ala Val Gly Leu Gly Val Ala Ala Val
35 40 45
Ala Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Phe Gln Ile Trp Lys Pro Leu Glu Gln
50 55 60
Val Ile Thr Ala Thr Ala Arg Lys Ile Ser Ser Pro Ser Phe Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Tyr Lys Gly Gly Phe Glu Gln Lys Met Ser Lys Arg Glu Ala Ser
85 90 95
Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Gly Lys Ala Lys Ile Arg Thr
100 105 110
Ala His Lys Arg Ile Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys Gly Gly Ser
115 120 125
Pro Tyr Val Ala Ser Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu Leu Glu Ala
130 135 140
Ser Ser Lys Ala Asn
145

<210> 4
<211> 150
<212> PRT
<213> 智人
<400> 4

Met Ala Ala Arg Gly Val Ile Ala Pro Val Gly Glu Ser Leu Arg Tyr
1 5 10 15
Ala Glu Tyr Leu Gln Pro Ser Ala Lys Arg Pro Asp Ala Asp Val Asp
20 25 30
Gln Gln Arg Leu Val Arg Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Gly Val Ala
35 40 45
Ala Leu Ala Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Phe Arg Ile Trp Lys Pro Leu
50 55 60
Glu Gln Val Ile Thr Glu Thr Ala Lys Lys Ile Ser Thr Pro Ser Phe
65 70 75 80
Ser Ser Tyr Tyr Lys Gly Gly Phe Glu Gln Lys Met Ser Arg Arg Glu
85 90 95
Ala Gly Leu Ile Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Gly Lys Ala Lys Ile
100 105 110
Arg Thr Ala His Arg Arg Val Met Ile Leu Asn His Pro Asp Lys Gly
115 120 125
Gly Ser Pro Tyr Val Ala Ala Lys Ile Asn Glu Ala Lys Asp Leu Leu
130 135 140
Glu Thr Thr Thr Lys His
145 150

<210> 5
<211> 2404
<212> DNA
<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<223> 智人DnaJ (Hsp40)同系物C亚家族，成员15，mRNA (cDNA克隆MGC:110875 IMAGE:30530999)，全cds

<400> 5

agtctccggg ccgccttgcc atggctgccc gtggtgtcat cgctccagtt ggcgagagtt 60
tgcgctacgc tgagtacttg cagccctcgg ccaaacggcc agacgccgac gtcgaccagc 120
agagactggt aagaagtttg atagctgtag gcctgggtgt tgcagctctt gcatttgcag 180
gtcgctacgc atttcggatc tggaaacctc tagaacaagt tatcacagaa actgcaaaga 240
agatttcaac tcctagcttt tcatcctact ataaaggagg atttgaacag aaaatgagta 300
ggcgagaagc tggtcttatt ttaggtgtaa gcccatctgc tggcaaggct aagattagaa 360
cagctcatag gagagtcatg attttgaatc acccagataa aggtggatct ccttacgtag 420
cagccaaaat aaatgaagca aaagacttgc tagaaacaac caccaaacat tgatgcttaa 480
ggaccacact gaaggaaaaa aaaagagggg acttcaaaaa aaaaaaaaaa gccctgcaaa 540
atattctaaa acatggtctt cttaattttc tatatggatt gaccacagtc ttatcttcca 600
ccattaagct gtataacaat aaaatgttaa tagtcttgct ttttattatc ttttaaagat 660
ctccttaaat tctataactg atctttttttc ttattttgtt tgtgacattc atacattttt 720
aagatttttg ttatgttctg aattcccccc tacacacaca cacacacaca cacacacaca 780
cgtgcaaaaa atatgatcaa gaatgcaatt gggatttgtg agcaatgagt agacctctta 840
ttgtttatat ttgtaccctc attgtcaatt tttttttagg gaatttggga ctctgcctat 900
ataaggtgtt ttaaatgtct tgagaacaag cactggctga tacctcttgg agatatgatc 960
tgaaatgtaa tggaatttat taaatggtgt ttagtaaagt aggggttaag gacttgttaa 1020
agaaccccac tatctctgag accctatagc caaagcatga ggacttggag agctactaaa 1080
atgattcagg tttacaaaat gagccctgtg aggaaaggtt gagagaagtc tgaggagttt 1140
gtatttaatt atagtcttcc agtactgtat attcattcat tactcattct acaaatattt 1200
attgacccct tttgatgtgc aaggcactat cgtgcgtccc ctgagagttg caagtatgaa 1260
gcagtcatgg atcatgaacc aaaggaactt atatgtagag gaaggataaa tcacaaatag 1320
tgaatactgt tagatacaga tgatatattt taaaagttca aaggaagaaa agaatgtgtt 1380
aaacactgca tgagaggagg aataagtggc atagagctag gctttagaaa agaaaaatat 1440
tccgatacca tatgattggt gaggtaagtg ttattctgag atgagaatta gcagaaatag 1500
atatatcaat cggagtgatt agagtgcagg gtttctggaa agcaaggttt ggacagagtg 1560
gtcatcaaag gccagccctg tgacttacac tgcattaaat taatttctta gaacatagtc 1620
cctgatcatt atcactttac tattccaaag gtgagagaac agattcagat agagtgccag 1680
cattgtttcc cagtattcct ttacaaatct tgggttcatt ccaggtaaac tgaactactg 1740
cattgtttct atcttaaaat acttttaga tatcctagat gcatctttca acttctaaca 1800
ttctgtagtt taggagttct caaccttggc attattgaca tgttaggcca aataattttt 1860
tttgtgggag gtctcttgtg cgttttagat gattagcaat aatccctgac ctgttatcta 1920
ctaaagacta gtcgtttctc atcagttgtg acaacaaaaa tggttccaga tattgccaaa 1980
tgccctttag aggacagtaa tcgcccccag ttgagaacca tttcagtaaa actttaatta 2040

ctatttttc ttttggttta taaaataatg atcctgaatt aaattgatgg aaccttgaag 2100
tcgataaaat atatttcttg ctttaaagtc cccatacgtg tcctactaat tttctcatgc 2160
tttagtgttt tcacttttct cctgttatcc ttgtacctaa gaatgccatc ccaatcccca 2220
gatgtccacc tgcccaaagt ctaggcatag ctgaaggcca agctaaaatg tatccctctt 2280
tttctggtac atgcagcaaa agtaatatga attatcagct ttctgagagc aggcattgta 2340
tctgtcttgt ttggtgttac attggcaccc aataaatatt tgttgagcga aaaaaaaaaa 2400
aaaa 2404

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 6
gtgggggtgt ctgtgaagta gttt 24

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 7
ctgggattta aggagttcac aa 22

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 8
ccgaatacct gcctccttct g 21

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 9
acacagcggg gagaaggtt 19

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 10
ccaaaggtcg gacgccgaca tc 22
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 11
aagtaatcac ggcaacagca agg 23
<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 12
aataaaagcc tggcagcctt gc 22

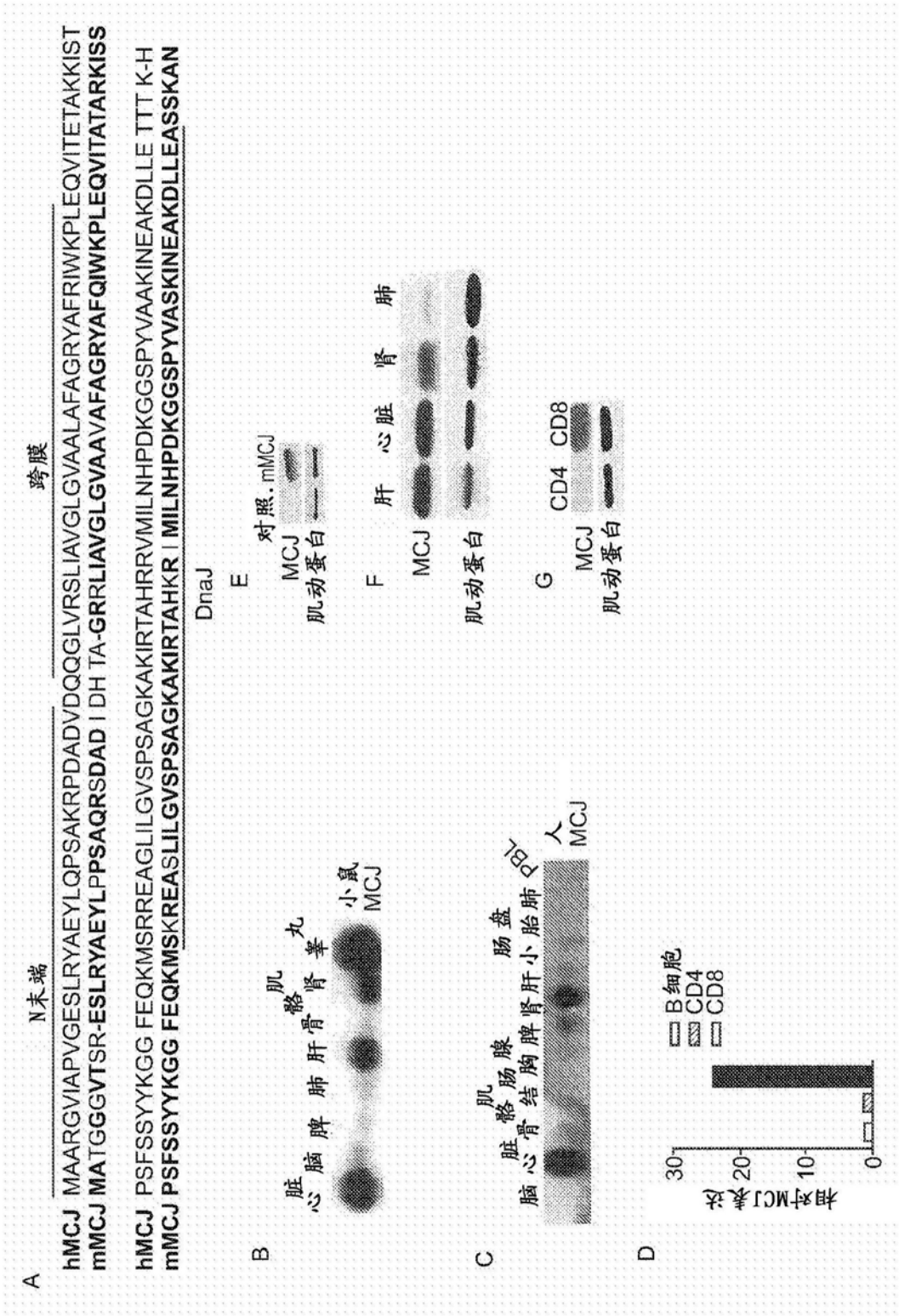

A
N末端
跨膜
hMCJ MAARGVIAPVGESLRYAEYLQPSAKRPDADVDQQGLVRSLIAVGLGVAALAFAGRYAFRIWKPLEQVITETAKKIST
mMCJ MATGGGVTSR-ESLRYAEYLPPSAQRSDAD I DH TA-GRRLIAVGLGVAAVAFAGRYAFQIWKPLEQVITATARKISS
hMCJ PSFSSYYKGG FEQKMSRREAGLILGVSPSAGKAKIRTAHRRVMILNHPDKGGSPYVAAKINEAKDLLE TTT K-H
mMCJ PSFSSYYKGG FEQKMSKREASLILGVSPSAGKAKIRTAHKR I MILNHPDKGGSPYVASKINEAKDLLEASSKAN
DnaJ
B
心脏
脑
脾
肺
肝
骨骼肌
肾
睾丸
小鼠
MCJ
C
脑
心脏
骨骼肌
结肠腺
胸脾
肾肝
小肠盘
肺
PBL
人
MCJ
D
B细胞
CD4
CD8
相对MCJ表达
30
20
10
0
E
对照.mMCJ
MCJ
肌动蛋白
F
肝
心脏
肾
肺
MCJ
肌动蛋白
G
CD4
CD8
MCJ
肌动蛋白

图1

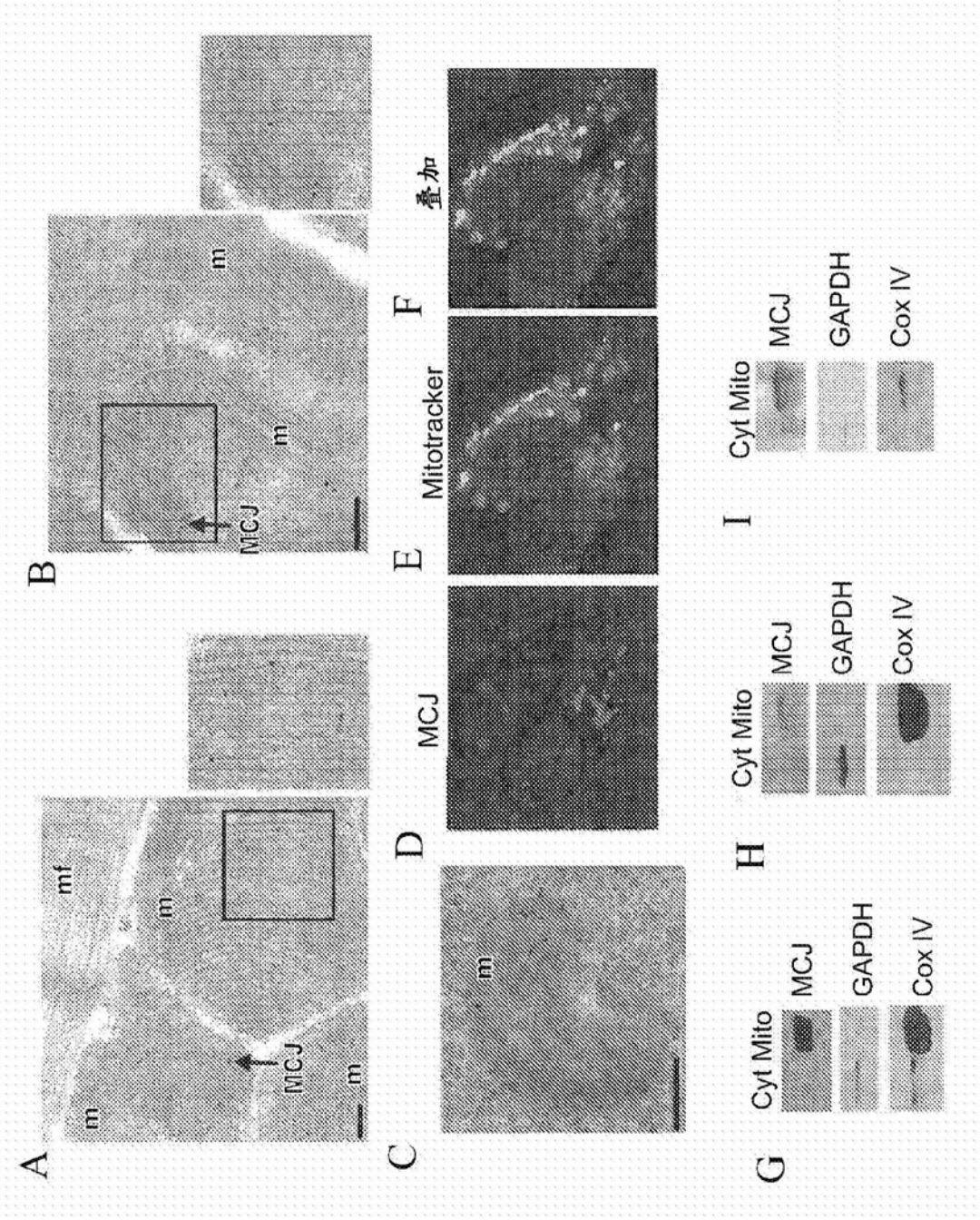

A
mf
m
m
MCJ
m
B
m
MCJ
m
C
m
D
MCJ
E
Mitotracker
F
叠加
G
Cyt Mito
MCJ
GAPDH
Cox IV
H
Cyt Mito
MCJ
GAPDH
Cox IV
I
Cyt Mito
MCJ
GAPDH
Cox IV

图2

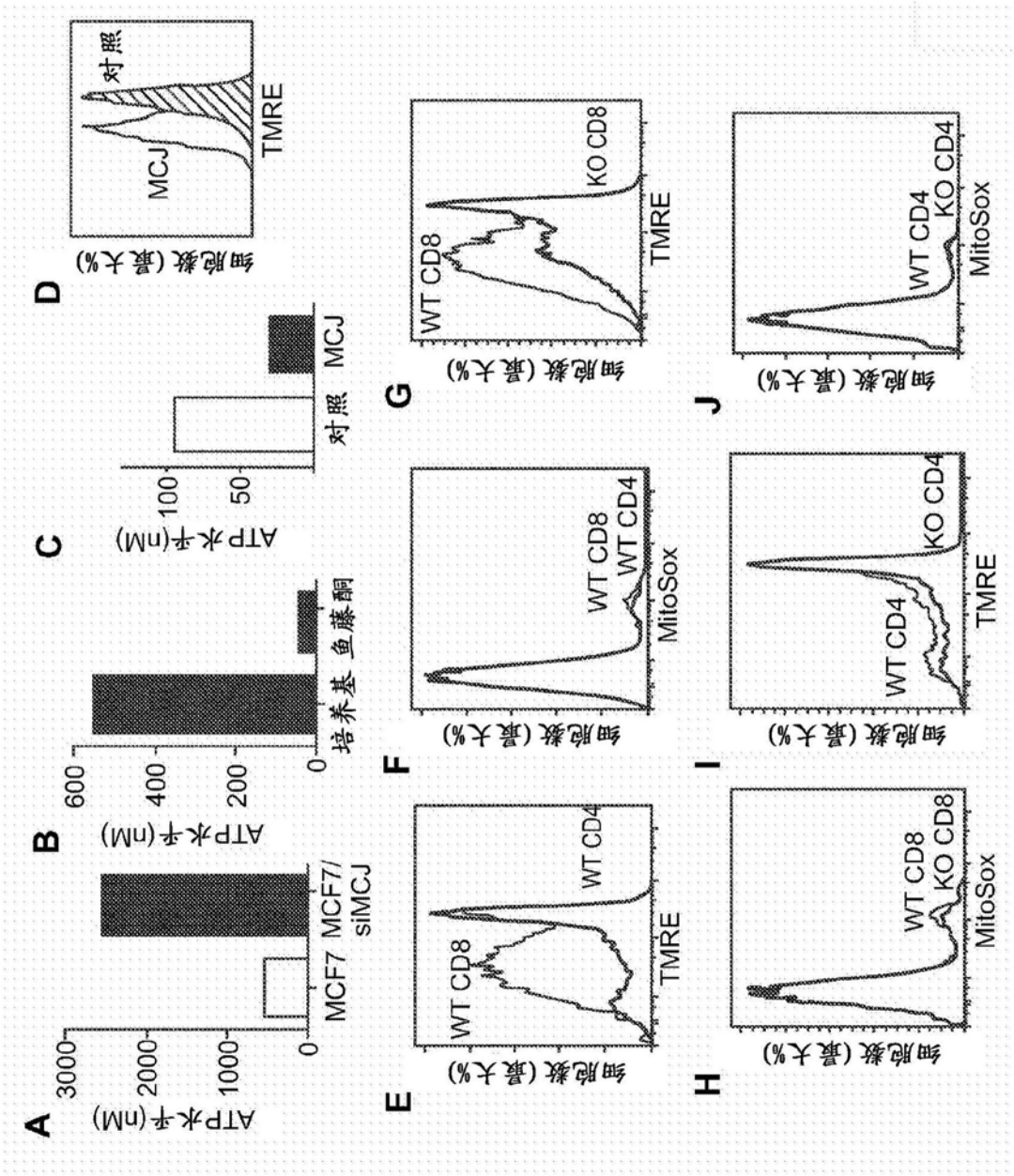

A
ATP水平(nM)
3000
2000
1000
0
MCF7
MCF7/ siMCJ
B
ATP水平(nM)
600
400
200
0
培养基
鱼藤酮
C
ATP水平(nM)
100
50
对照
MCJ
D
细胞数 (最大%)
对照
MCJ
TMRE
E
细胞数 (最大%)
WT CD8
WT CD4
TMRE
F
细胞数 (最大%)
WT CD8
WT CD4
MitoSox
G
细胞数 (最大%)
WT CD8
KO CD8
TMRE
H
细胞数 (最大%)
WT CD8
KO CD8
MitoSox
I
细胞数 (最大%)
WT CD4
KO CD4
TMRE
J
细胞数 (最大%)
WT CD4
KO CD4
MitoSox

图3

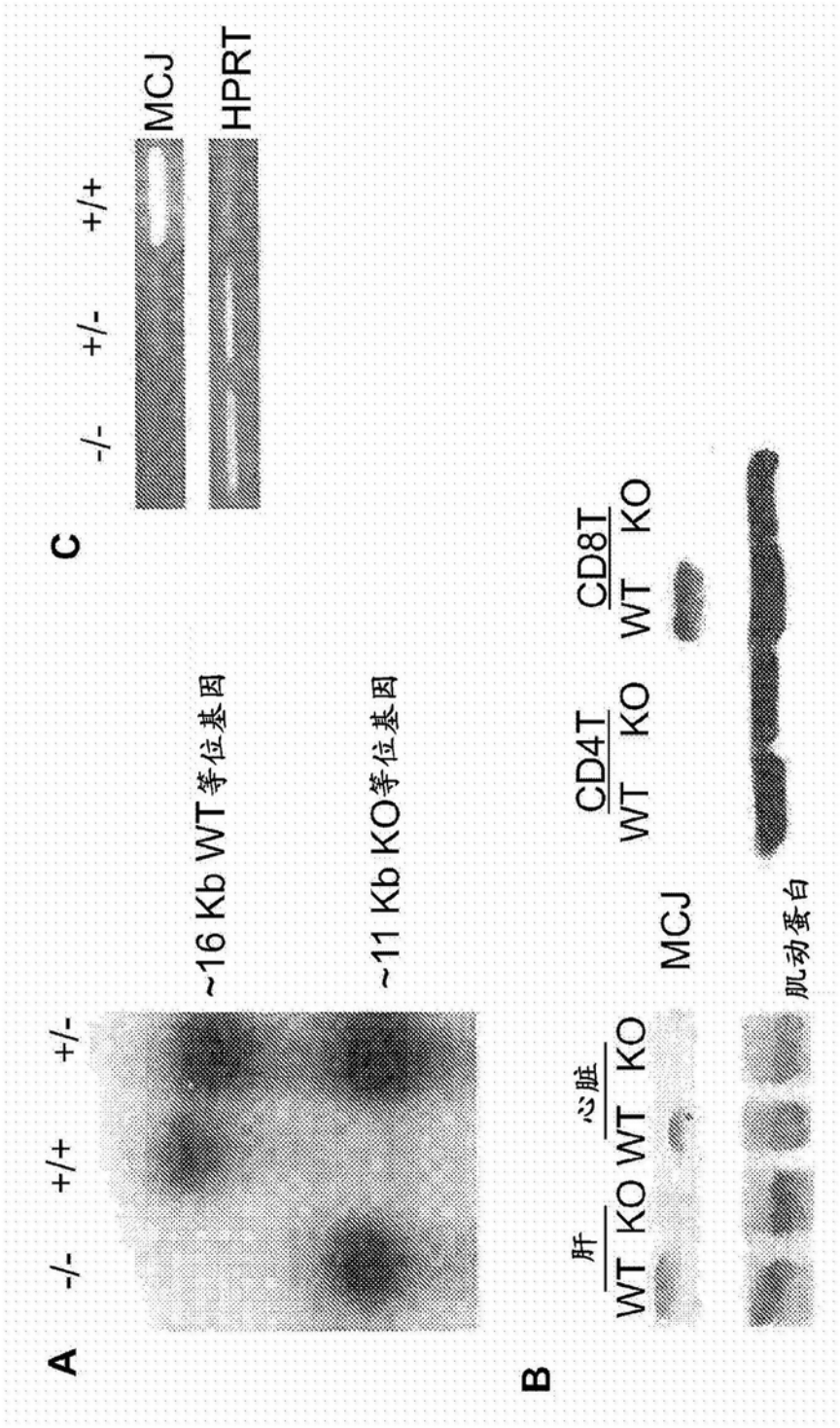

A
-/-
+/+
+/-
~16 Kb WT等位基因
~11 Kb KO等位基因
B
肝
WT KO
心脏
WT KO
MCJ
CD4T
WT KO
CD8T
WT KO
肌动蛋白
C
-/-
+/-
+/+
MCJ
HPRT

图4

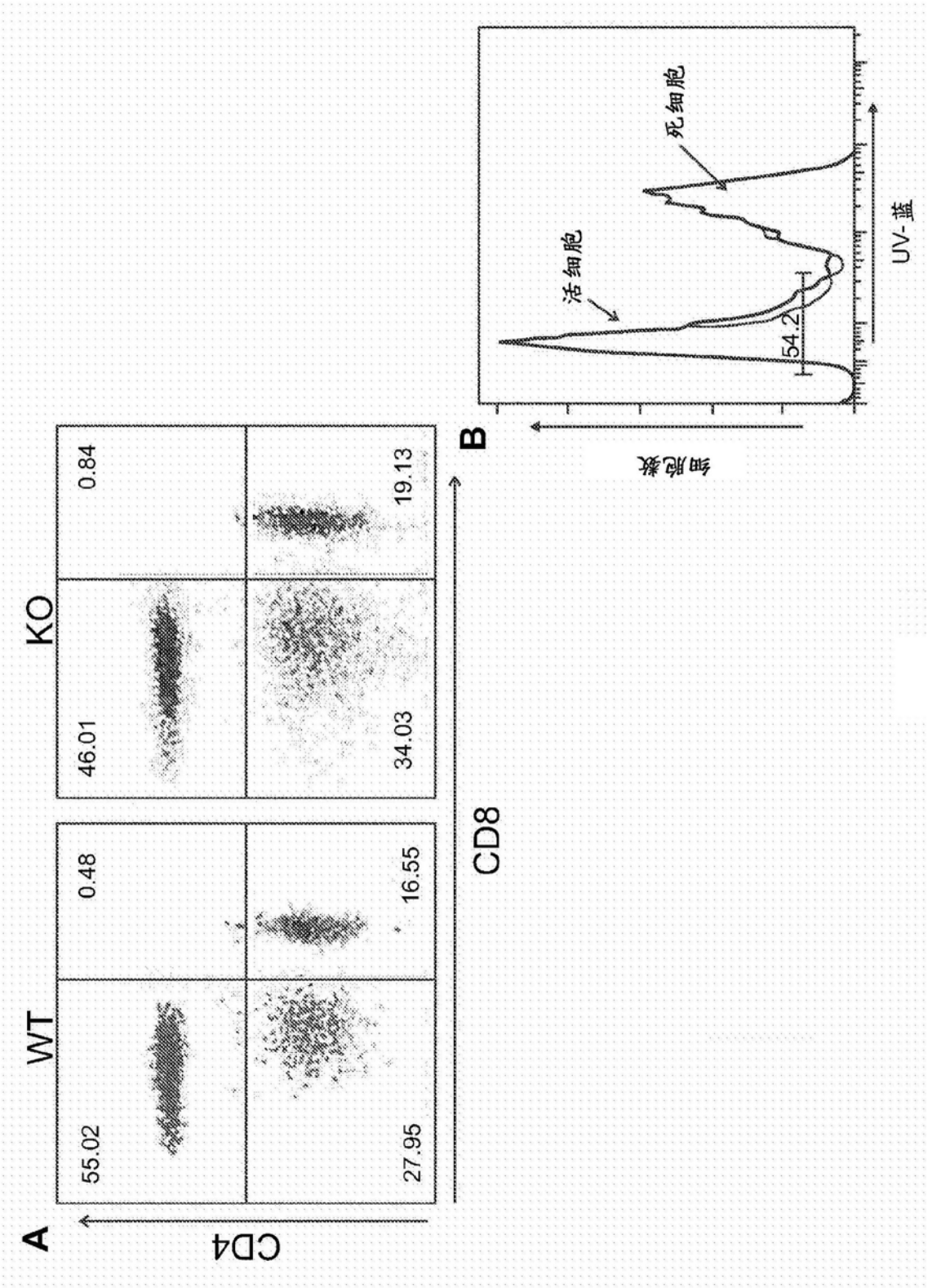

A
WT
KO
CD4
CD8
55.02
0.48
46.01
0.84
27.95
16.55
34.03
19.13
B
细胞数
活细胞
死细胞
54.2
UV-蓝

图5

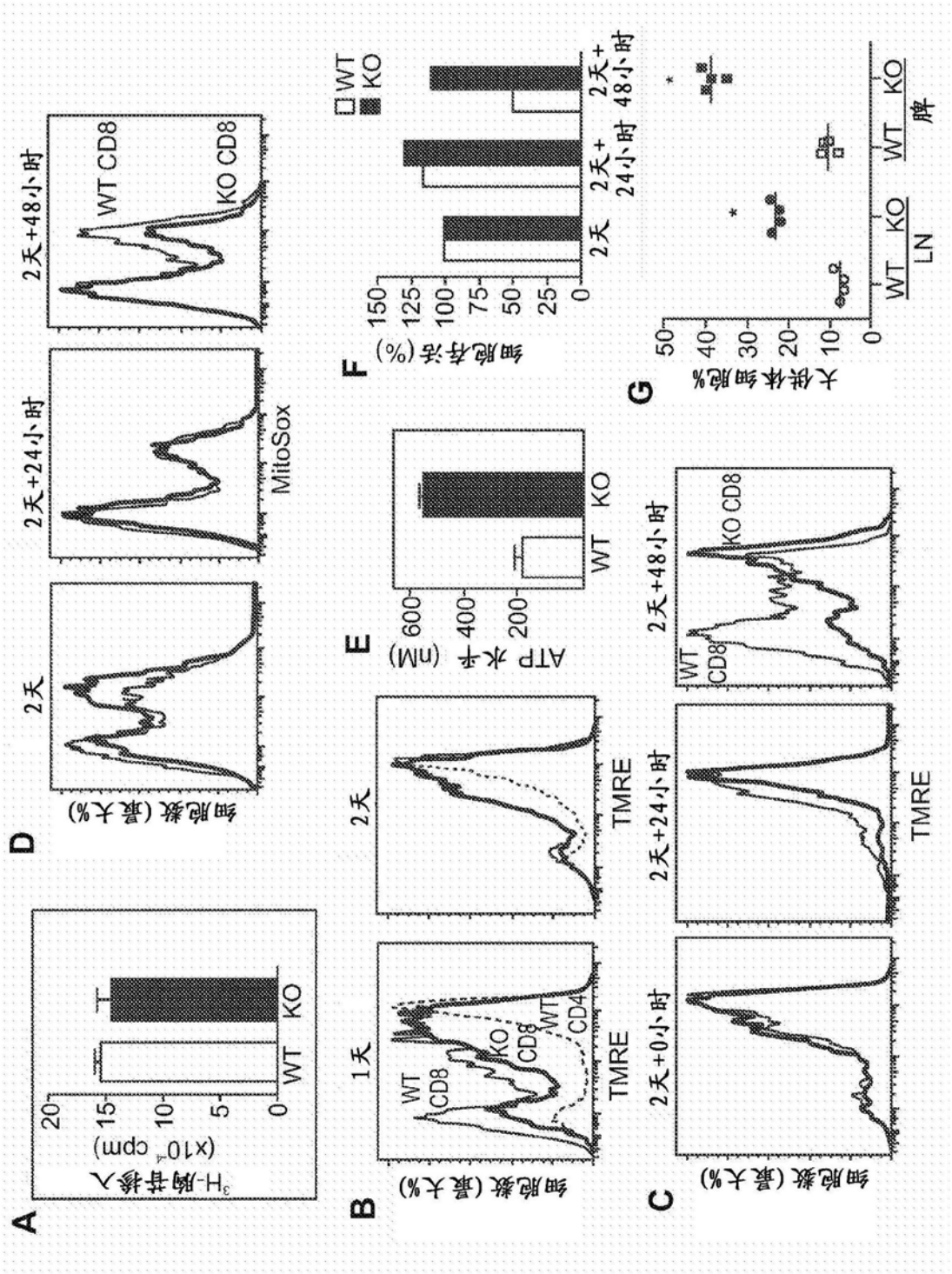

A
^{3}H-胸苷掺入 (x10^{-4} cpm)
WT
KO
B
细胞数(最大%)
1天
WT CD8
KO CD8
WT CD4
TMRE
C
细胞数(最大%)
2天+0小时
2天+24小时
2天+48小时
WT CD8
KO CD8
TMRE
D
细胞数(最大%)
2天
2天+24小时
2天+48小时
WT CD8
KO CD8
MitoSox
E
ATP水平 (nM)
WT
KO
F
细胞存活(%)
WT
KO
2天
2天+24小时
2天+48小时
G
大供体细胞%
WT
KO
LN
WT
KO
脾

图6

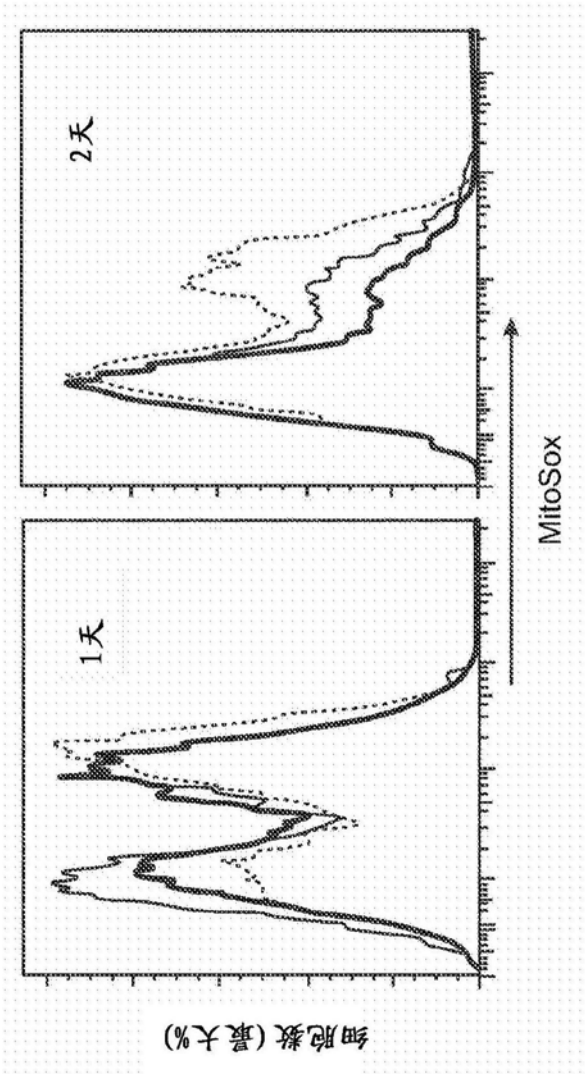


图7

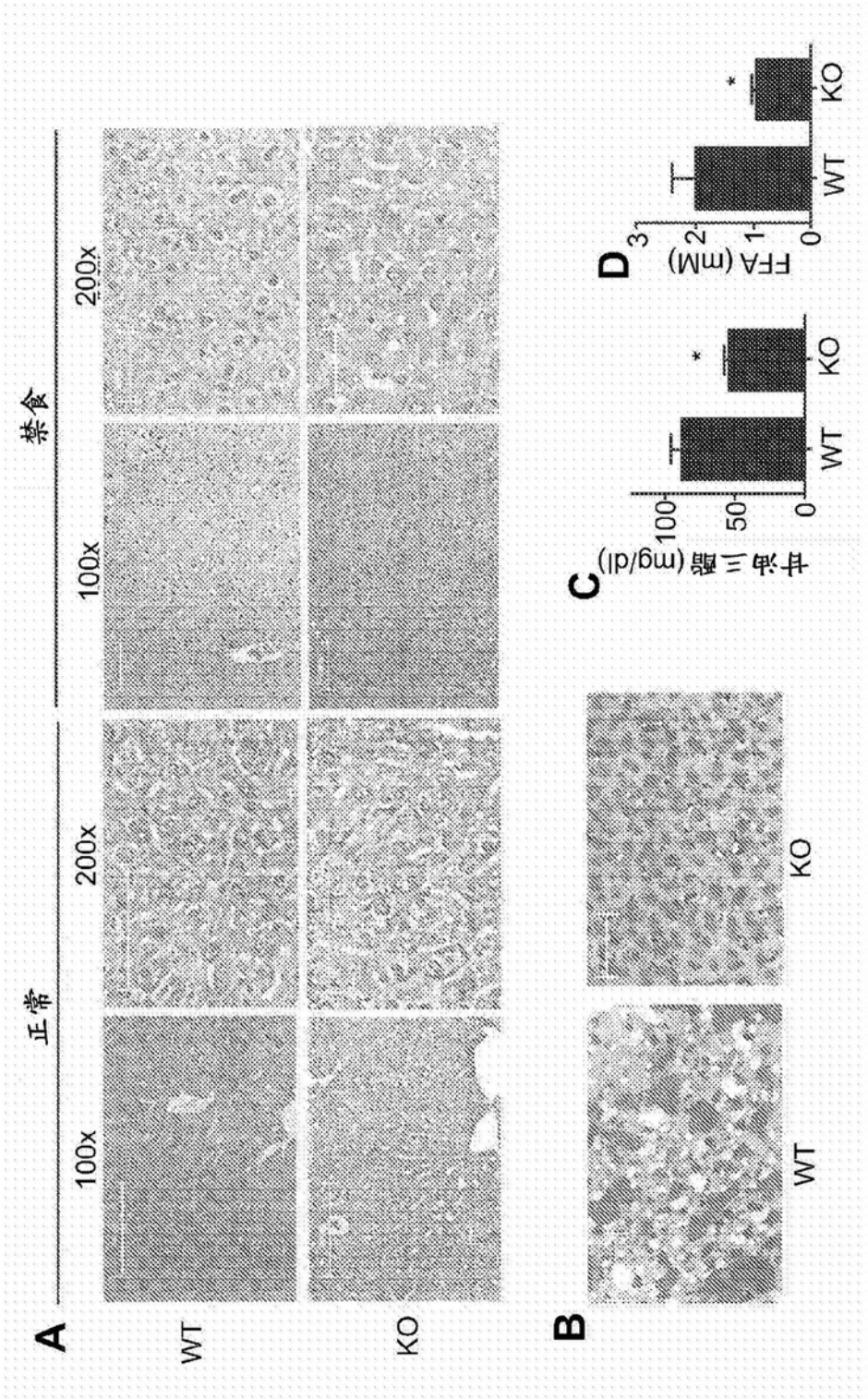

A
正常
禁食
100x
200x
100x
200x
WT
KO
B
WT
KO
C
甘油三酯 (mg/dl)
0
50
100
WT
KO
*
D
FFA (mM)
0
1
2
3
WT
KO
*

图8

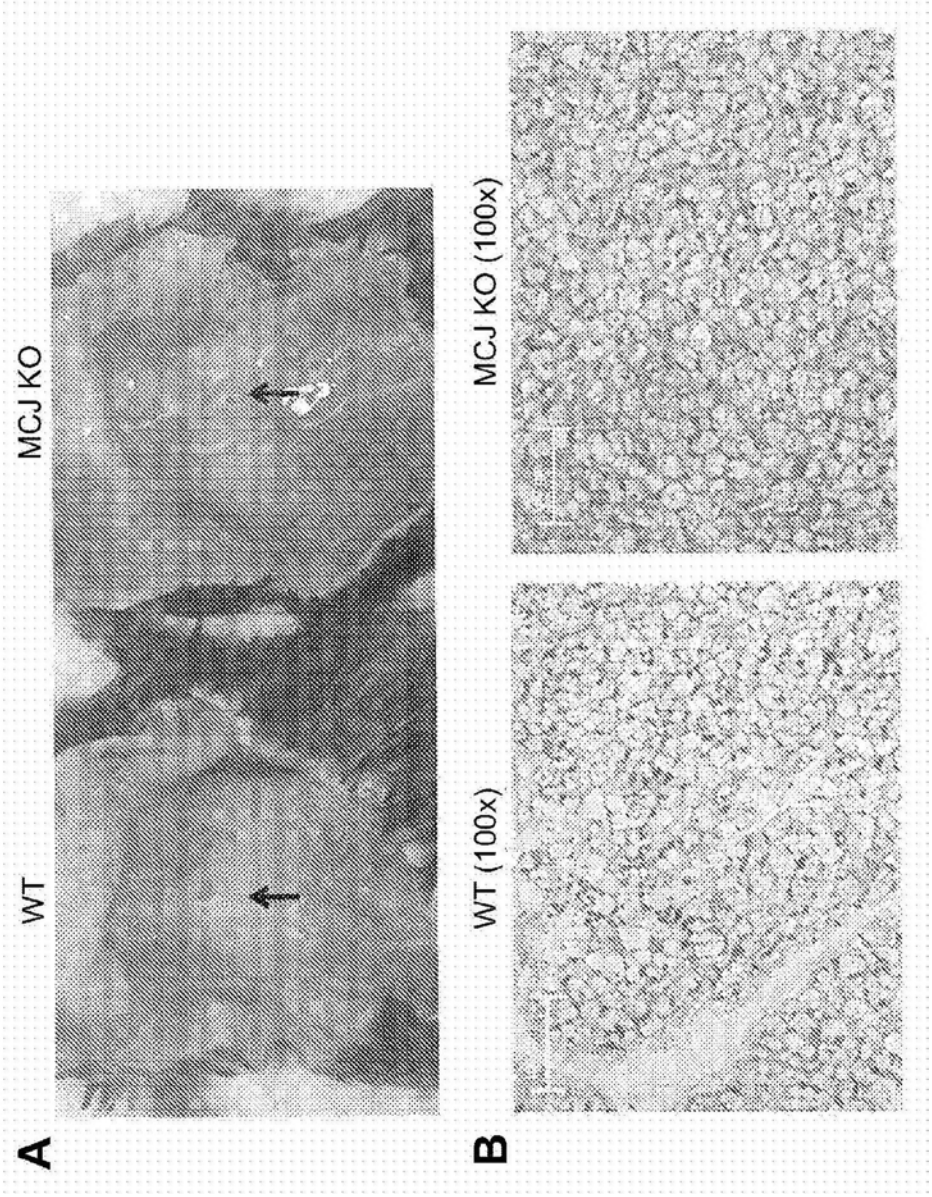


图9

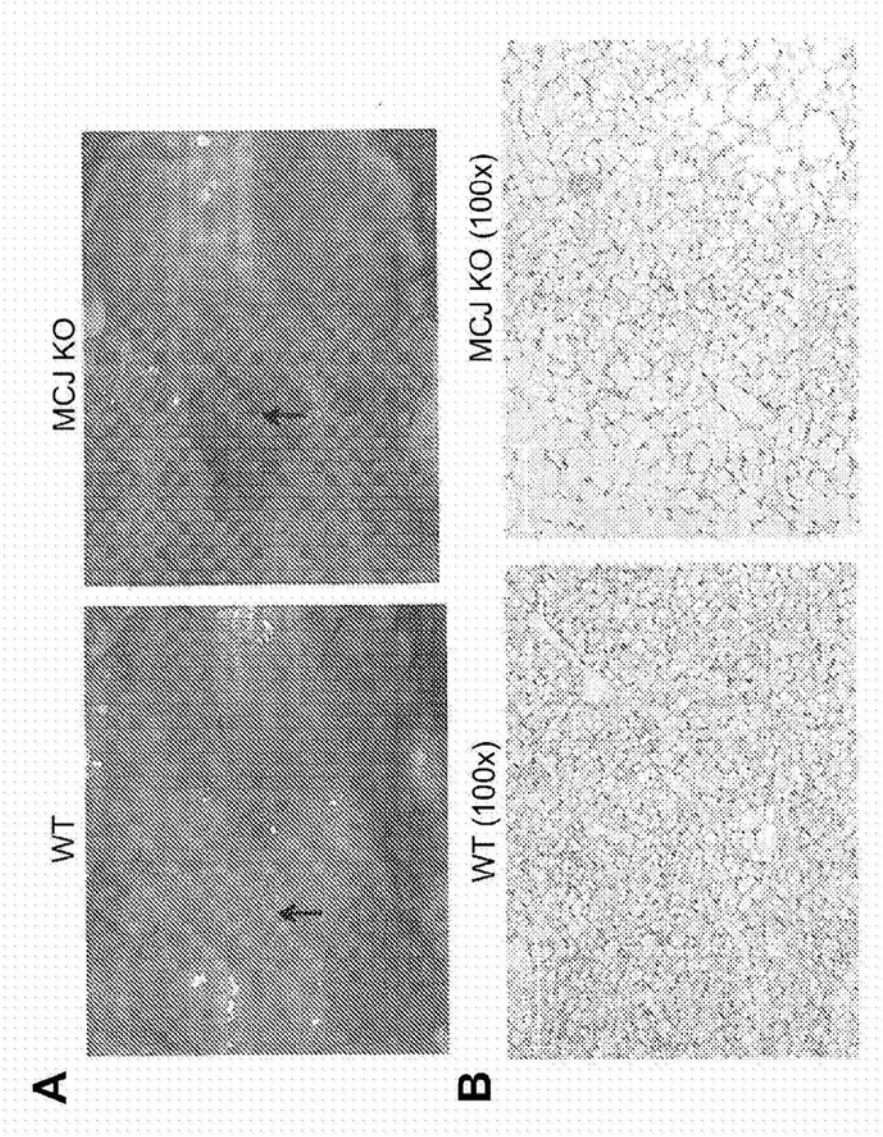


图10

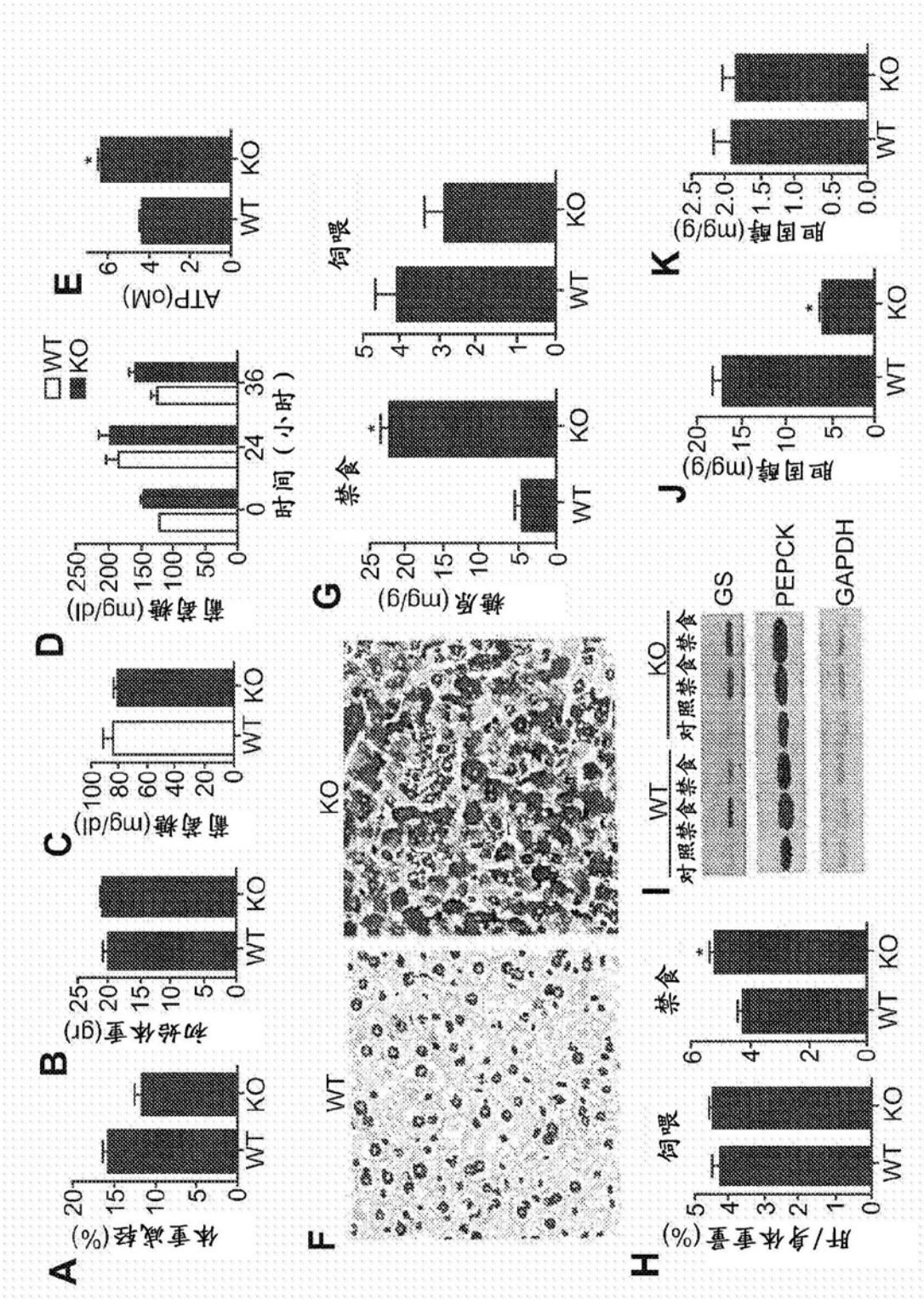

A
体重减轻(%)
B
初始体重(gr)
C
葡萄糖(mg/dl)
D
葡萄糖(mg/dl)
时间（小时）
E
ATP(oM)
F
WT
KO
G
禁食
饲喂
糖原(mg/g)
H
肝/身体重量(%)
I
WT
KO
对照禁食禁食
GS
PEPCK
GAPDH
J
胆固醇(mg/g)
K
胆固醇(mg/g)

图11

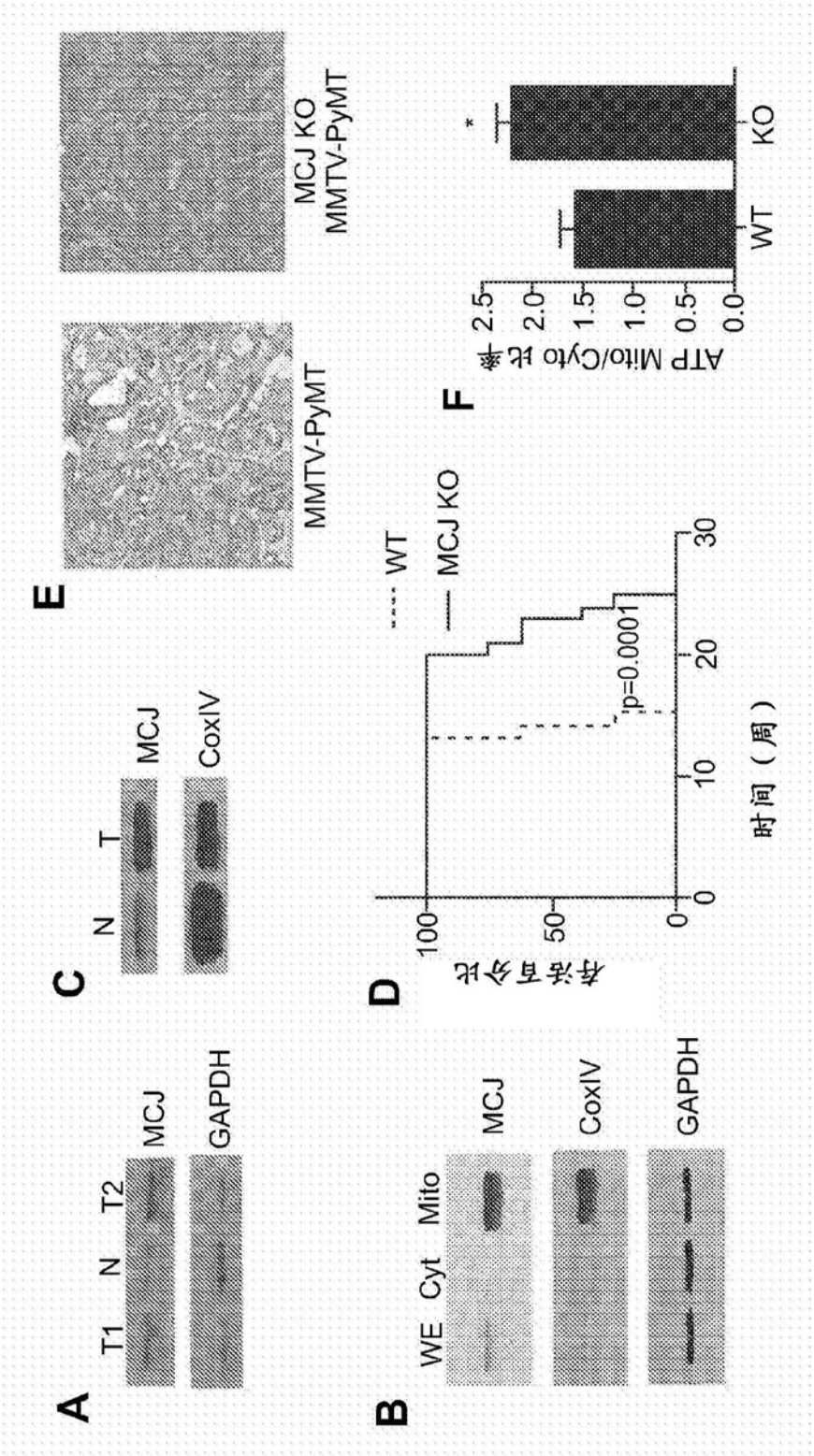

A
T1
N
T2
MCJ
GAPDH
B
WE
Cyt
Mito
MCJ
CoxIV
GAPDH
C
N
T
MCJ
CoxIV
D
WT
MCJ KO
p=0.0001
存活百分比
时间（周）
E
MMTV-PyMT
MCJ KO
MMTV-PyMT
F
ATP Mito/Cyto比率
WT
KO

图12

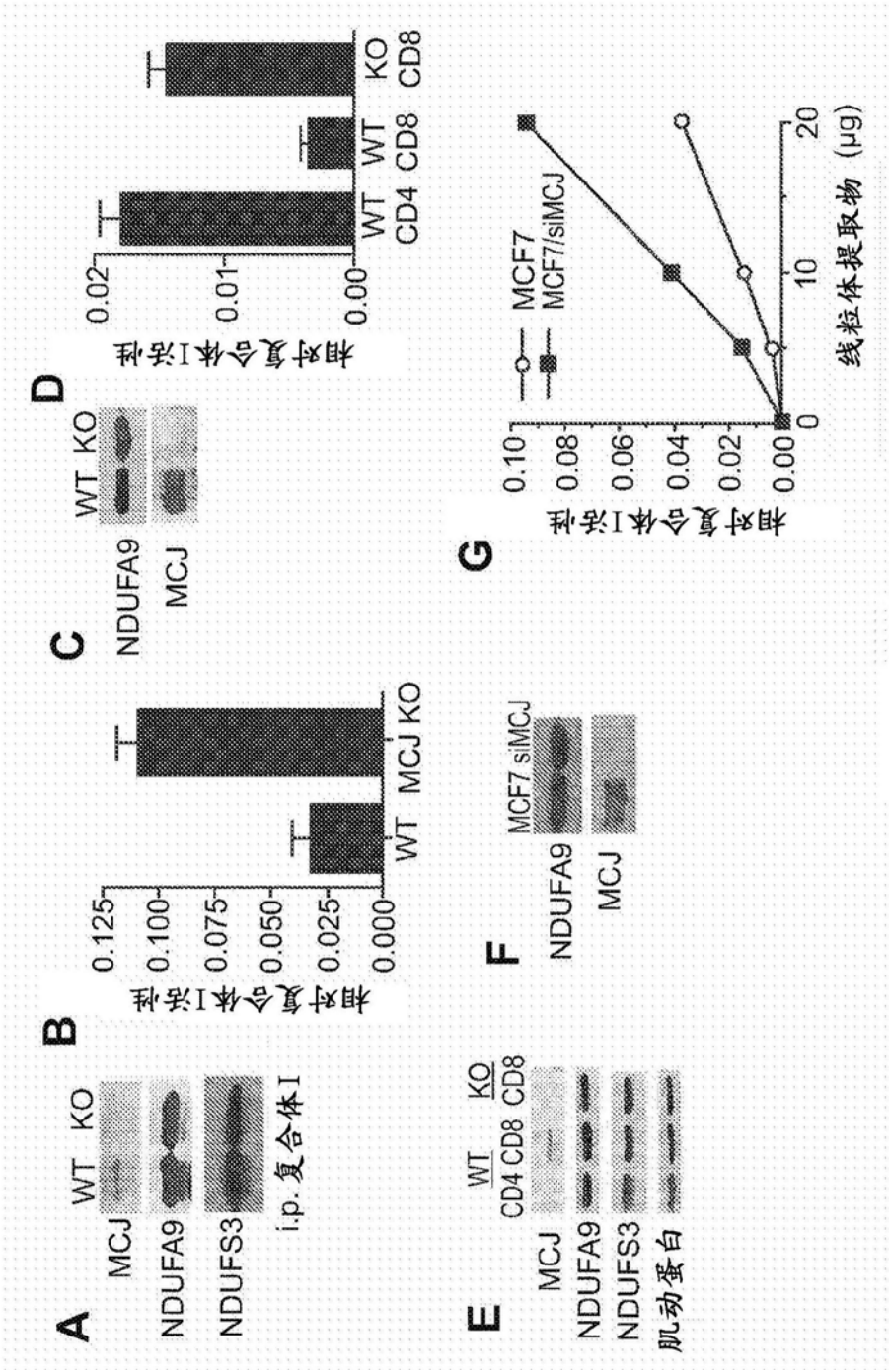

A
WT KO
MCJ
NDUFA9
NDUFS3
i.p. 复合体I
B
相对复合体I活性
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
WT MCJ KO
C
WT KO
NDUFA9
MCJ
D
相对复合体I活性
0.02
0.01
0.00
WT CD4
WT CD8
KO CD8
E
WT
CD4 CD8
KO
CD8
MCJ
NDUFA9
NDUFS3
肌动蛋白
F
MCF7 siMCJ
NDUFA9
MCJ
G
相对复合体I活性
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
MCF7
MCF7/siMCJ
0
10
20
线粒体提取物 (μg)

图13