(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 111655340 A
(43)申请公布日 2020.09.11

(21)申请号 201880060882.7

(22)申请日 2018.09.19

(30)优先权数据
17306229.0 2017.09.20 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/075286 2018.09.19

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/057742 EN 2019.03.28

(71)申请人 国家医疗保健研究所
地址 法国巴黎
申请人 巴黎公共救济院 索邦大学
巴黎大学

(72)发明人 G·克洛伊梅 J·M·布拉沃-桑

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 孟凡宏 谢燕军

(51)Int.Cl.
A61P 35/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)

权利要求书2页 说明书33页
序列表2页 附图7页

(54)发明名称

用于调节自噬的方法和药物组合物

(57)摘要

自噬典型地通过饥饿激活，从而允许细胞和生物体动员其能量储备。已知自噬的药理调节代表治疗潜力。本文中，发明人报道了以非常规的自噬依赖性方式从细胞释放的蛋白质，即地西泮结合抑制剂(DBI)，调节自噬。特别地，发明人证实DBI抑制自噬，并且向小鼠提供重组DBI增强糖酵解，增强脂肪生成，并且抑制脂肪酸氧化。发明人表明，单克隆抗体对DBI的中和作用和引发自身抗体的免疫原性DBI衍生物的主动免疫诱导自噬，并导致代谢变化，从而增加饥饿诱导的体重减轻，减少再进食时的食物摄入，并降低响应于高热量饮食的体重增加。因此，本发明涉及基于对DBI的活性或表达的调节来调节自噬的方法和药物组合物。

CN 111655340 A

1.一种在有需要的受试者中抑制自噬的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的促进DBI的活性或表达的试剂。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者体重不足。

3.根据权利要求2所述的方法,其中所述受试者患有消瘦性病症。

4.根据权利要求2所述的方法,其中所述受试者患有厌食症恶病质、老年人的厌食症、神经性厌食症、与癌症相关的恶病质、与AIDS相关的恶病质、与心力衰竭相关的恶病质、与囊性纤维化相关的恶病质、与类风湿性关节炎相关的恶病质、与肾脏疾病相关的恶病质、与慢性阻塞性肺疾病(COPD)相关的恶病质、与ALS相关的恶病质、与肾衰竭相关的恶病质以及与异常食欲、脂肪量、能量平衡和/或非自愿体重减轻相关的其他病症。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有选自下组的疾病:癌症疾病、神经退行性疾病、心血管疾病、感染性疾病、自身免疫性疾病和/或炎性疾病。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述促进DBI的活性的试剂在于一种多肽,所述多肽包含:i)与SEQ ID NO:1具有至少80%的同一性的氨基酸序列,或ii)与SEQ ID NO:1中第17位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或iii)与SEQ ID NO:1中第33位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或iv)与SEQ ID NO:1中第43位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述促进DBI的表达的试剂是编码根据权利要求6所述的多肽的核酸分子。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述核酸分子包含与SEQ ID NO:2具有至少50%同一性的核酸序列。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述促进DBI的活性的试剂是模拟DBI的活性的有机小分子或拟肽。

10.一种在有需要的受试者中刺激自噬的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的抑制DBI的活性或表达的试剂。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述受试者超重。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述受试者患有肥胖症。

13.根据权利要求10所述的方法,其中所述受试者患有2型糖尿病或代谢综合征。

14.根据权利要求10所述的方法,其中所述受试者患有癌症;神经退行性疾病;感染性疾病;肺部疾病,诸如肺气肿、囊性纤维化;肝病、胰腺炎或蛋白病。

15.根据权利要求14所述的方法,其包括向所述患有癌症的受试者施用治疗有效量的抑制DBI的活性或表达的试剂和治疗有效量的化疗剂,其中在所述化疗剂之前,施用所述抑制DBI的活性或表达的试剂。

16.根据权利要求10所述的方法,其中所述抑制DBI的活性的试剂是针对DBI的抗体或适配子。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体针对的片段在于第43位的氨基酸残基至第50位的氨基酸残基的氨基酸序列。

18.根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体是单克隆嵌合抗体、单克隆人源化抗体或单克隆人抗体。

19.根据权利要求10所述的方法，其中所述抑制DBI的表达的试剂是表达抑制剂，诸如siRNA、核酸内切酶、反义寡核苷酸或核酶。

20.根据权利要求10所述的方法，其中所述抑制DBI的活性的试剂在于适合于当向受试者施用时引发针对DBI的中和性自身抗体的疫苗组合物。

21.根据权利要求10所述的方法，其中所述疫苗组合物包含作为多肽的抗原，所述多肽包含：i)与SEQ ID NO:1具有至少80％的同一性的氨基酸序列，或ii)与SEQ ID NO:1中第17位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80％同一性的氨基酸序列，或iii)与SEQ ID NO:1中第33位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80％同一性的氨基酸序列，或iv)与SEQ ID NO:1中第43位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80％同一性的氨基酸序列。

22.根据权利要求10所述的方法，其中所述多肽与载体蛋白结合，所述载体蛋白通常是足够外来的，以引起对疫苗的强免疫应答。

23.根据权利要求10所述的方法，其中所述疫苗组合物包含佐剂。

24.一种筛选适合于调节自噬的化合物的方法，包括：i)提供候选化合物，ii)测定所述候选化合物是否能够调节DBI的活性或表达，以及iii)正向选择所述能够调节DBI的活性或表达的候选化合物。

25.一种测定受试者是否处于体重调节风险中的方法，包括：i)测定从所述受试者获得的血液样品中DBI的水平，ii)将在步骤i)中测定的水平与预定参考值相比较，和iii)当测定出在步骤i)中测定的水平与预定参考值之间存在差异时，得出所述受试者处于体重调节的风险中的结论。

26.一种在其受试者中治疗非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的抑制DBI的活性或表达的试剂。

27.根据权利要求16所述的方法，其中所述NAFLD是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

用于调节自噬的方法和药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于调节自噬的方法和药物组合物。

背景技术

[0002] 自噬(“自食”)构成细胞生物学中最引人注目的(尽管被精细地调节)的现象之一，并且通过促进细胞质结构的更新并允许细胞适应不断变化且有压力的条件(包括营养缺乏)，在维持细胞和生物体内稳态中起关键作用(1、2)。几种无前导蛋白的细胞分泌(其只能通过绕过高尔基体的非常规途径释放)与自噬密切相关(3-7)。此蛋白的一种是被称为地西泮结合蛋白(DBI)或酰基辅酶A(CoA)结合蛋白(ACBP)的系统发育古老因子(3,4)。人或小鼠DBI是87个氨基酸(10kDa)的小蛋白，其具有两种完全不同的功能，即作为细胞内的ACBP(其中其结合长链酰基CoA分子)和作为细胞外的DBI(其中完整的蛋白质或其裂解产物，triacontatetraneuropeptide[TTN,残基17-50]和十八神经肽[ODN,残基33-50]，可以与A型γ-氨基丁酸受体($GABA_AR$)的苯并二氮卓结合位点相互作用并调节其作为GTP蛋白偶联受体(GPCR)的活性)(8-10)。DBI及其蛋白水解片段还结合外周型苯并二氮卓受体(PBR)(11-13)以及未鉴定的GPCR(ODN-GPCR)(14-17)。但是，从未研究过DBI分泌在自噬反馈调节中的作用。

[0003] 发明简述

[0004] 本发明涉及用于调节自噬的方法和药物组合物。特别地，本发明由权利要求书限定。

[0005] 发明详述

[0006] 自噬典型地通过饥饿来激活，允许细胞和生物体动员其能量储备。在这里，发明人报道了以非常规的自噬依赖性方式，即地西泮结合抑制剂(DBI)(也称为酰基辅酶A结合蛋白(ACBP))从细胞释放的蛋白质在三个水平上调节自噬。首先，自噬引起DBI分泌，从而从细胞中耗尽这种促自噬因子(自分泌调节)。其次，自噬导致细胞外空间中DBI的积累，允许DBI作用于其他细胞以抑制自噬(旁分泌调节)。第三，循环DBI刺激进食行为，从而消除了自噬诱导(内分泌调节)的主要原因。在人类中，肥胖者的血浆DBI水平升高。向小鼠额外提供重组DBI增强糖酵解作用、增强脂肪生成并抑制脂肪酸氧化。发明人还设计了三种中和DBI的策略，即通过诱导性全身敲除、被动免疫和通过免疫原性DBI衍生物引发自身抗体的主动免疫。这些策略有利于增加饥饿引起的体重减轻并减少再进食后的食物摄入的代谢变化。

[0007] 一般定义：

[0008] 如本文所用，术语“受试者”、“个体”或“患者”可互换使用，并且是指需要进行诊断、处理或治疗的任何受试者，特别是人。其他受试者可包括牛、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马等。在一些优选的实施方案中，所述受试者是人。

[0009] 除非另有说明，否则术语“自噬”是指宏观自噬，其是涉及细胞自身组分(诸如长寿蛋白质、蛋白质聚集体、细胞器、细胞膜、细胞器膜和其他细胞组分)降解的代谢过程。自噬的机制可包括：(i)在细胞靶区域周围形成膜，将内容物与其余细胞质分开，(ii)所得囊泡

与溶酶体融合，随后囊泡内容物降解。术语自噬也可以指饥饿细胞将营养从非必要过程重新分配到更重要过程的机制之一。同样，例如，自噬可抑制一些疾病的发展，并起到抵抗细胞内病原体感染的保护作用。急性、间歇性或持续性刺激自噬可延迟老化和与老化相关的疾病，包括动脉硬化、心脏功能不全、癌症和神经退行性疾病。刺激自噬还可以减少高脂或高糖饮食或高盐诱导的体重增加、肥胖、代谢综合征、高血压和糖尿病。

[0010] 如本文所用，术语“体重指数”具有其在本领域中的一般含义，并且是指计算为体重/以平方米表示的身高的比率(kg/m^2)。BMI提供了一种简单的方法来评估个体的体重与他或她身高的人的正常或期望体重相差多少。BMI类别的常见定义如下：饥饿-BMI小于15kg/m^2；体重不足-BMI小于18.5kg/m^2；理想-BMI为18.5-25kg/m^2；超重-BMI为25-30kg/m^2；肥胖-BMI为30-40kg/m^2；病态肥胖-BMI大于40kg/m^2。尽管很简单，但表征人的体重特性的BMI方法并不总是正确的。例如，BMI没有考虑以下因素：诸如骨架大小、肌肉性或例如个体之间的骨骼、软骨和水重量的变化比例。因此，与机体脂肪量实际水平相关的BMI准确性可能因诸如健身水平、肌肉量、骨骼结构、性别和种族等因素而失真。而且，身材矮小的人和老年人趋于具有较低BMI值。但是，可以认为本领域技术人员(例如医生)在对任何给定个人进行BMI评估时将能够考虑这些因素。

[0011] 如本文所用，术语“癌症”具有其在本领域中的一般含义，并且包括但不限于实体瘤和血源性肿瘤。术语癌症包括皮肤、组织、器官、骨、软骨、血液和血管的疾病。术语“癌症”还涵盖原发性和转移性癌症两者。可以通过本发明的方法和组合物治疗的癌症的实例包括但不限于来自以下的癌细胞：膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳房、结肠、食道、胃肠道、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫。此外，癌症可具体地为以下组织学类型，但不限于这些：肿瘤，恶性；癌；癌，未分化；巨细胞和梭形细胞癌；小细胞癌；乳头状癌；鳞状细胞癌；淋巴上皮癌；基底细胞癌；毛母质癌；移行细胞癌；乳头状移行细胞癌；腺癌；胃泌素瘤，恶性；胆管癌；肝细胞癌；合并的肝细胞癌和胆管癌；小梁腺癌；腺样囊性癌；腺瘤性息肉中的腺癌；腺癌，家族性结肠息肉；实体癌；类癌瘤，恶性；支气管肺泡腺癌；乳头状腺癌；嫌色细胞癌；嗜酸性粒细胞癌；嗜酸性腺癌；嗜碱性粒细胞癌；透明细胞腺癌；颗粒细胞癌；滤泡性腺癌；乳头状和滤泡状腺癌；非包膜性硬化癌；肾上腺皮质癌；子宫内膜样癌；皮肤附属癌；大汗腺癌；皮脂腺癌；耳垢；腺癌；粘液表皮样癌；囊腺癌；乳头状囊腺癌；乳头状浆液性囊腺癌；粘液性囊腺癌；粘液腺癌；印戒细胞癌；浸润性导管癌；髓样癌；小叶癌；炎性癌；佩吉特病，乳腺癌；腺泡细胞癌；腺鳞癌；腺癌伴鳞状化生；胸腺瘤，恶性；卵巢间质瘤，恶性；肉瘤，恶性；颗粒细胞瘤，恶性；和母细胞瘤(roblastoma)，恶性；Sertoli细胞癌；睾丸间质细胞瘤，恶性；脂质细胞瘤，恶性；副神经节瘤，恶性；乳腺外副神经节瘤，恶性；嗜铬细胞瘤；血管球肉瘤；恶性黑色素瘤；无色素性黑色素瘤；浅表扩散性黑色素瘤；巨大色素痣中的恶性黑色素瘤；上皮样细胞黑色素瘤；蓝色痣，恶性；肉瘤；纤维肉瘤；纤维组织细胞瘤，恶性；粘液肉瘤；脂肪肉瘤；平滑肌肉瘤；横纹肌肉瘤；胚胎性横纹肌肉瘤；肺泡横纹肌肉瘤；间质肉瘤；混合瘤，恶性；米勒管混合瘤；肾母细胞瘤；肝母细胞瘤；癌肉瘤；间叶瘤，恶性；勃勒纳瘤(brenner tumor)，恶性；叶状肿瘤，恶性；滑膜肉瘤；间皮瘤，恶性；无性细胞瘤；胚胎癌；畸胎瘤，恶性；卵巢甲状腺肿，恶性；绒毛膜癌；中肾瘤，恶性；血管肉瘤；血管内皮瘤，恶性；卡波西肉瘤；血管外皮细胞瘤，恶性；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；皮质骨肉瘤；软骨肉瘤；软骨母细胞瘤，恶性；间充质软骨肉瘤；骨巨细胞瘤；尤因肉瘤；牙源性肿瘤，恶性；成釉

细胞性牙肉瘤;成釉细胞瘤,恶性;成釉细胞纤维肉瘤;松果体,恶性;脊索瘤;胶质瘤,恶性;室管膜瘤;星形细胞瘤;原生质星形细胞瘤;纤维型星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突胶质细胞瘤;少突神经母细胞瘤;原始神经外胚层;小脑肉瘤;神经节细胞母细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;脑膜瘤,恶性;神经纤维肉瘤;神经鞘瘤,恶性;颗粒细胞瘤,恶性;恶性淋巴瘤;霍奇金病;霍奇金淋巴瘤;副肉芽肿;恶性淋巴瘤,小淋巴细胞;恶性淋巴瘤,大细胞,弥漫性;恶性淋巴瘤,滤泡;蕈样真菌病;其他指定的非霍奇金淋巴瘤;恶性组织细胞病;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增殖性小肠疾病;白血病;淋巴白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;髓样白血病;嗜碱性粒细胞白血病;嗜酸粒细胞白血病;单核细胞白血病;肥大细胞白血病;巨核母细胞白血病;骨髓肉瘤;和毛细胞白血病。

[0012] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指任何长度的氨基酸的聚合形式,其可以包括编码和非编码的氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸和具有修饰的肽骨架的多肽。该术语包括融合蛋白,包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白;具有异源和同源信号序列的融合蛋白;具有或不具有N端甲硫氨酸残基的融合蛋白;免疫标记蛋白等。

[0013] 如本文所用,术语“DBI”具有其在本领域中的一般含义,并且是指地西泮结合抑制剂,由DBI基因(基因ID:1622)编码的酰基-CoA结合蛋白。该术语也称为EP;ACBP;ACBD1;和CCK-RP。示例性的人氨基酸序列由NCNI参考序列NP_001073331.1(SEQ ID NO:1)(酰基-CoA结合蛋白同种型1)表示。示例性的人核酸序列由NCNI参考序列NM_001079862.2(SEQ ID NO:2)(酰基-CoA结合蛋白同种型1)表示。

[0014] SEQ ID NO:1

[0015] MSQAEFEKAA EEVRHLKTKP SDEEMLFIYG HYKQATVGDI NTERPGMLDF TGKAKWDAWN ELKGTSKEDA MKAYINKVEE LKKKYGI

[0016] SEQ ID NO:2

GCTCGCCCGA GCAGGGTTGG GGCGAGTGGA

[0017]

CCGCGCCTCT AAAGGCGCTT GCCAGTGCAA TCTGGGCGAT

CGCTTCCTGG TCCTCGCCTC CTCCGCTGTC TCCCTGGAGT

TCTTGCAAGT CGGCCAGGAT GTCTCAGGCT GAGTTTGAGA

AAGCTGCAGA GGAGGTTAGG CACCTTAAGA CCAAGCCATC

GGATGAGGAG ATGCTGTTCA TCTATGGCCA CTACAAACAA

GCAACTGTGG GCGACATAAA TACAGAACGG CCCGGGATGT

TGGACTTCAC GGGCAAGGCC AAGTGGGATG CCTGGAATGA

GCTGAAAGGG ACTTCCAAGG AAGATGCCAT GAAAGCTTAC

[0018] ATCAACAAAG TAGAAGAGCT AAAGAAAAAA TACGGGATAT GAGAGACTGG ATTTGGTTAC TGTGCCATGT GTTTATCCTA AACTGAGACA ATGCCTTGTT TTTTTCTAAT ACCGTGGATG GTGGGAATTC GGGAAAATAA CCAGTTAAAC CAGCTACTCA AGGCTGCTCA CCATACGGCT CTAACAGATT AGGGGCTAAA ACGATTACTG ACTTTCCTTG AGTAGTTTTT ATCTGAAATC AATTAAAAGT GTATTTGTTA CTTTAAATAA CTTTAAAAAA AAAA

[0019] 如本文所用，术语“DBI活性”是指DIB的任何生物活性，其包括：抑制自噬、诱导低血糖、刺激食物摄取、刺激体重增加、降低脂肪酸氧化、上调葡萄糖转运蛋白、上调PPARG、刺激葡萄糖摄取、刺激糖酵解或刺激脂肪生成。

[0020] 如本文所用，术语“治疗”是指预防性或防护性治疗以及治愈性或疾病改良性治疗，包括治疗具有患病风险或疑似已患病的患者以及生病或已被诊断患有疾病或医学病症的患者，并包括抑制临床复发。可以向患有医学病症或最终可能患有病症的受试者施用治疗，以便预防、治愈、延迟病症或复发病症的一种或多种症状的发作、降低病症或复发病症的一种或多种症状的严重性或改善病症或复发病症的一种或多种症状，或者以便将受试者的生存期延长至超过在没有这种治疗的情况下预期的生存期。“治疗方案”是指疾病的治疗模式，例如治疗期间使用的剂量模式。治疗方案可包括诱导方案和维持方案。短语“诱导方案”或“诱导期”是指用于疾病初始治疗的治疗方案(或治疗方案的一部分)。诱导方案的总体目标是在治疗方案的初始阶段向患者提供高水平的药物。诱导方案可以采用(部分或全部)“加载方案”，其可包括施用比医生在维持方案期间采用的剂量更大的药物，比医生在维持方案期间所施用的更频繁地施用药物，或两者皆有。短语“维持方案”或“维持期”是指在治疗疾病期间用于维持患者的治疗方案(或治疗方案的一部分)，例如，使患者长期保持缓解(几个月或几年)。维持方案可以采用持续治疗(例如，以规律的间隔(例如，每周、每月、每年等)施用药物)或间歇治疗(例如，中断治疗、间歇治疗、复发时的治疗或实现特定的预定标准[例如，疾病临床表现等]时的治疗)。

[0021] “治疗有效量”是指用于达到治疗效果的本发明试剂的足够量。但是，应该理解，本发明化合物和组合物的每日总用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何特定受试者的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素，包括正在治疗的病症和该病症的严重程度；所采用的特定化合物的活性；所采用的特定组合物；受试者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食；所用特定化合物的施用时间、施用途径和分泌速率；治疗的持续时间；与所采用的特定化合物联合或同时使用的药物；以及医学领域众所周知的类似因素。例如，以低于实现所需治疗效果所需剂量的水平开始化合物的剂量并逐渐增加剂量直至实现所需效果，这在本领域技术范围内。但是，产品的日剂量可以在每个成人每天0.01-4,000mg的宽范围内变化。典型地，组合物含有0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250、500和1000mg的活性成分，用于对症调节待治疗受试者的剂量。典型地，药物含有约0.01mg-约1000mg的活性成分。通常以每天0.0002mg/kg体重-约50mg/kg体重，尤其是每

天约0.001mg/kg-10mg/kg体重的剂量水平提供有效量的药物。

[0022] 抑制自噬的方法：

[0023] 因此，本发明的第一目的涉及一种在有需要的受试者中抑制自噬的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的促进DBI的活性或表达的试剂。

[0024] 在一些实施方案中，根据本发明的抑制自噬的方法特别适合于刺激食欲并因此增加体重。特别地，本发明的方法还特别适合于促进葡萄糖摄取和脂肪生成。因此，本发明的方法特别适用于治疗如下文所述的各种疾病。

[0025] 因此，在一些实施方案中，受试者体重不足。如本文中，术语“体重不足”是指体重指数低于18.5的受试者。

[0026] 体重不足可能是由于多种原因引起的，例如代谢快速、饮食不佳/不足或饥饿(营养不良)、肠道功能缺陷引起的吸收不良、内分泌失调(例如I型糖尿病)、心理问题(诸如神经性厌食症、躯体变形障碍、压力和焦虑)和由于慢性病和衰老引起的体重减轻。一般而言，体重不足的根本原因必须加以治疗，且体重不足也可能危害健康，因此必须对其本身进行治疗。事实上，体重不足的人通常体力较差，免疫系统较弱，并且患诸如骨质疏松症、心脏病和血管疾病的疾病的风险较高。此外，在女性中，体重不足会导致性发育延迟、迟发性闭经或妊娠期并发症。

[0027] 在一些实施方案中，所述受试者患有消瘦性病症(wasting disorder)。如本文所用，术语“消瘦性病症”具有其在本领域中的一般含义，并且包括但不限于厌食症恶病质、老年人的厌食症、神经性厌食症、与癌症相关的恶病质、与AIDS相关的恶病质、与心力衰竭相关的恶病质、与囊性纤维化相关的恶病质、与类风湿性关节炎相关的恶病质、与肾脏疾病相关的恶病质、与慢性阻塞性肺疾病(COPD)相关的恶病质、与ALS相关的恶病质、与肾衰竭相关的恶病质以及与异常食欲、脂肪量、能量平衡和/或非自愿体重减轻相关的其他病症。

[0028] 在一些实施方案中，受试者患有“恶病质”。如本文所用，术语“恶病质”用于由于机体脂肪和肌肉质量的损失而造成的体质消瘦的病症。通常，恶病质可与以下病症相关并由于以下病症而引起：诸如癌症、获得性免疫缺陷综合症(AIDS)、心脏病、传染病、休克、烧伤、内毒素血症、器官炎症、手术、糖尿病、胶原蛋白疾病、放疗和化疗。在许多这些疾病中，恶病质可能会显著促进发病率或死亡率。易发展恶病质状态的另一组特定个体是已经经历诸如可以在胃癌和溃疡患者上实施的胃切除术的那些个体。

[0029] 在一些实施方案中，所述受试者患有厌食症。如本文所用，术语“厌食症”具有其在本领域中的一般含义，并且是指特征在于食欲明显降低或对食物的完全厌恶的任何饮食失调。在一些实施方案中，所述受试者患有神经性厌食症。通常，患有神经性厌食症的受试者的BMI小于17.5kg/m^2。

[0030] 因此，本发明涉及治疗表现出一种或多种消瘦性病症的患者以及降低危重患者的死亡率和发病率的方法，所述消瘦性病症是诸如厌食症恶病质、老年人的厌食症、神经性厌食症、与癌症相关的恶病质、与AIDS相关的恶病质、与心力衰竭相关的恶病质、与囊性纤维化相关的恶病质、与类风湿性关节炎相关的恶病质、与肾病相关的恶病质、与COPD相关的恶病质、与ALS相关的恶病质、与肾衰竭相关的恶病质或髋部骨折，包括向需要这种治疗的所述患者施用治疗有效的促进DBI的活性或表达的试剂。

[0031] 在一些实施方案中，所述受试者患有选自下组的疾病：癌症疾病、神经退行性疾

病、心血管疾病、感染性疾病、自身免疫性疾病和/或炎性疾病。

[0032] 在一些实施方案中，所述受试者患有癌症。特别地，自噬似乎对于肿瘤进展是必不可少的，为肿瘤提供了增加代谢所需的结构和能量。通过施用单独或与化疗药物联合使用可促进DBI的活性或表达的试剂调节肿瘤的代谢环境可抑制基础和饥饿诱导的自噬，从而使肿瘤细胞对死亡敏感。因此，促进本发明的DBI的活性或表达的试剂将适用于治疗晚期癌症。在一些实施方案中，所述癌症是自噬感受态癌症(autophagy competent cancer)。如本文所用，术语“自噬感受态癌症”表示其中可能发生自噬的癌症。在一些实施方案中，未检测到ATG5或ATG7缺陷。在本发明的上下文中，术语“ATG5或ATG7缺陷”是指受试者的肿瘤细胞或其部分具有ATG5或ATG7功能障碍，ATG5或ATG7基因的低表达或无表达。典型地，所述缺陷可归因于ATG5或ATG7基因的突变，使得前ARNm通过NMD(无义介导的衰变)系统降解。典型地，所述缺陷也可能是由突变导致，使得蛋白质被错误折叠并通过蛋白酶体降解。所述缺陷也可能由导致蛋白质功能障碍的功能突变的丧失导致。所述缺陷还可能由基因表达的表观遗传控制(例如甲基化)导致，使得基因在受试者的细胞中较少表达。所述缺陷也可能是由于特定信号通路诱导的ATG5或ATG7基因的抑制导致。所述缺陷也可能由控制ATG5或ATG7基因表达的核苷酸序列的突变导致。

[0033] 在一些实施方案中，所述受试者患有神经退行性疾病，对于该疾病，抑制自噬将是合适的。典型地，受试者患有肌萎缩性侧索硬化症。如本文所用，术语“肌萎缩性侧索硬化症(ALS)”包括已知的以经典(Charcot's)ALS、Lou Gehrig病、运动神经元疾病(MND)、进行性延髓性麻痹(PBP)、进行性肌肉萎缩症(PMA)、原发性侧索硬化症(PLS)、延髓发作性ALS、脊柱发作性ALS和涉及多系统的ALS命名的神经变性综合征系列(Wijesekera LC and Leigh PN.Amyotrophic lateral sclerosis.Orphanet)。

[0034] 在一些实施方案中，受试者患有肌肉减少症。如本文所用，术语“肌肉减少症”是指由老化引起的骨骼肌质量的逐渐减少，其可以直接引起肌肉力量的减少，从而导致各种身体功能的减少和损害。

[0035] 促进DBI的活性或表达的试剂：

[0036] 在一些实施方案中，促进DBI的活性的试剂是与SEQ ID NO:1的序列或其片段具有至少80％的同一性的多肽。

[0037] 根据本发明，与第二氨基酸序列具有至少80％同一性的第一氨基酸序列是指第一序列与第二氨基酸序列具有80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％的同一性。序列同一性经常用同一性百分比(或相似性或同源性)来测量。百分比越高，两个序列越相似。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。多种程序和比对算法在以下中描述：Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.,2:482,1981;Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.,48:443,1970;Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,85:2444,1988;Higgins和Sharp,Gene,73:237-244,1988;Higgins和Sharp,CABIOS,5:151-153,1989;Corpet et al.Nuc.Acids Res.,16:10881-10890,1988;Huang et al.,Comp.Appls Biosci.,8:155-165,1992;以及Pearson et al.,Meth.Mol.Biol.,24:307-31,1994).Altschul et al.,Nat.Genet.,6:119-129,1994,提出了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。举例来说，比对工具ALIGN(Myers和Miller,CABIOS 4:11-17,1989)或LFASTA(Pearson和Lipman,1988)可用于进行序列比较(Internet Program® 1996,

W.R.Pearson and the University of Virginia,fasta20u63 version 2.0u63,release date December 1996)。ALIGN比较彼此的整个序列,而LFASTA比较局部相似区域。例如,可以在因特网的NCSA网站上获得这些比对工具及其各自的教程。或者,对于大于约30个氨基酸的氨基酸序列的比较,可以使用默认BLOSUM62矩阵(设置为默认参数)来采用Blast 2序列函数(缺口存在罚分为11,每残基缺口罚分为1)。比对短肽(少于约30个氨基酸)时,使用Blast 2序列功能进行比对,将PAM30矩阵设置为默认参数(开放缺口9,延伸缺口1罚分)。例如,可以从NCBI网站上获得BLAST序列比较系统。还参见Altschul et al.,J.Mol.Biol.,215:403-410,1990;Gish.&States,Nature Genet.,3:266-272,1993;Madden et al.Meth.Enzymol.,266:131-141,1996;Altschul et al.,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402,1997;和Zhang&Madden,Genome Res.,7:649-656,1997。

[0038] 如本文所用,术语“片段”是指多肽(即SEQ ID NO:1)一级结构的物理上连续的部分。在一些实施方案中,片段包含SEQ ID NO:1的至少8个连续氨基酸。在一些实施方案中,片段包含8;9;10;11;12;13;14;15;16;17;18;19;20;21;22;23;24;25;26;27;28;29;30;31;32;33;34;35;36;37;38;39;40;41;42;43;44;45;46;47;48;49;50;51;52;53;54;55;56;57;58;59;60;61;62;63;64;65;66;67;68;69;70;71;72;73;74;75;76;77;78;79;80;81;82;83;84;85或86个连续氨基酸。根据本发明,片段应保留DBI的活性。

[0039] 在一些实施方案中,片段由第17位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列组成(即,triacontatetraneuropeptide或TTN)。

[0040] 在一些实施方案中,片段由第33位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列组成(即十八神经肽或ODN)。

[0041] 在一些实施方案中,片段由第43位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列组成(即八肽或OP)。

[0042] 因此,在一些实施方案中,促进DBI活性的试剂在于包含以下的多肽:

[0043] -与SEQ ID NO:1具有至少80%的同一性的氨基酸序列,或

[0044] -与SEQ ID NO:1中第17位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或

[0045] -与SEQ ID NO:1中第33位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或

[0046] -与SEQ ID NO:1的第43位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0047] 在一些实施方案中,本发明的多肽与至少一种异源多肽融合以形成融合蛋白。在一些实施方案中,本发明的多肽直接或通过在其C末端的间隔子与异源多肽的N末端融合,或在其N末端的间隔子与异源多肽的C末端融合。如本文所用,术语“直接”是指将本发明多肽的末端(N或C末端)的(第一个或最后一个)氨基酸与异源多肽的末端(N或C末端)的(第一个或最后一个)氨基酸融合。换言之,在该实施方案中,所述多肽的C末端的最后一个氨基酸通过共价键直接连接至所述异源多肽的N末端的第一个氨基酸,或所述多肽的N-末端的第一个氨基酸通过共价键直接连接至所述异源多肽的C-末端的最后一个氨基酸。如本文所用,术语“间隔子”是指将本发明的多肽连接至异源多肽的至少一个氨基酸的序列。这种间隔子可用于防止空间位阻。典型地,间隔子包括2;3;4;5;6;7;8;9;10;11;12;13;14;15;16;

17;18;19或20个氨基酸。

[0048] 在一些实施方案中,本发明的多肽与信号序列融合。信号序列可用于促进分泌蛋白或其他目标蛋白的分泌和分离。典型地,信号序列以疏水性氨基酸的核心为特征,所述疏水性氨基酸通常在分泌期间以一个或多个切割事件从成熟蛋白切割。这种信号肽含有加工位点,当它们通过分泌途径时,该加工位点允许从成熟蛋白上切割信号序列。

[0049] 在一些实施方案中,根据本发明的融合蛋白是免疫粘附素。如本文所用,术语"免疫粘附素"表示将本发明多肽的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能结合的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包含本发明多肽和免疫球蛋白恒定结构域序列的融合体。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可以获自任何免疫球蛋白,诸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亚型、IgA(包括IgA-1和IgA-2)、IgE、IgD或IgM。免疫球蛋白序列典型地但非必须是免疫球蛋白恒定结构域(Fc区)。免疫粘附素可以具有人抗体的许多有价值的化学和生物学特性。由于免疫粘附素可以由具有与适当的人免疫球蛋白铰链和恒定结构域(Fc)序列连接的所需特异性的人蛋白质序列构建,因此可以使用整个人组分来实现目标结合特异性。这种免疫粘附素对患者的免疫原性最低,并且对于长期或重复使用是安全的。在一些实施方案中,Fc区是天然序列Fc区。在一些实施方案中,Fc区是变体Fc区。在另一个实施方案中,Fc区是功能性Fc区。如本文所用,术语"Fc区"用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以变化,但是人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226或Pro230的氨基酸残基延伸至其羧基末端。免疫粘附素的粘附部分和免疫球蛋白序列部分可以通过最小接头连接。免疫球蛋白序列典型地但非必须是免疫球蛋白恒定结构域。本发明的嵌合体中的免疫球蛋白部分可以获自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型、IgA、IgE、IgD或IgM,但典型地是IgG1或IgG3。在一些实施方案中,本发明的多肽和免疫粘附素的免疫球蛋白序列部分通过最小接头连接。如本文所用,术语"接头"是指连接本发明的多肽和免疫球蛋白序列部分的至少一个氨基酸的序列。这种接头可用于防止空间位阻。在一些实施方案中,接头具有4;5;6;7;8;9;10;11;12;13;14;15;16;17;18;19;20;21;22;23;24;25;26;27;28;29;30个氨基酸残基。但是,上限不是关键性的,而是例如出于方便此类多肽的生物制药的理由而选择。接头序列可以是天然存在的序列或非天然存在的序列。如果用于治疗目的,则该接头优选在对其施用免疫粘附素的受试者中是非免疫原性的。一组有用的接头序列是如WO 96/34103和WO 94/04678中所述的衍生自重链抗体的铰链区的接头。其他实例是聚丙氨酸接头序列。

[0050] 通过本领域本身已知的任何技术,诸如但不限于,单独或组合的任何化学、生物学、遗传或酶促技术产生本发明的多肽。例如,了解所需序列的氨基酸序列,本领域技术人员可以通过用于产生氨基酸序列的标准技术容易地产生所述多肽。例如,它们可以使用众所周知的固相方法,优选使用可商购的肽合成设备(诸如Applied Biosystems,Foster City,California制造的肽合成设备)并按照制造商的说明进行合成。或者,可以通过如本领域目前所熟知的重组DNA技术合成本发明的多肽。例如,这些片段可以在将编码所需(多)肽的DNA序列掺入表达载体并将此类载体引入将表达所需多肽的合适的真核或原核宿主中后作为DNA表达产物获得,之后使用众所周知的技术将它们从其分离。

[0051] 在一些实施方案中,预期可以修饰在本发明的治疗方法中使用的本发明多肽,以改进其治疗功效。治疗化合物的此类修饰可用于降低毒性、增加循环时间或改变生物分布。

例如，通过与改变生物分布的多种药物载体介质结合，可以显著降低潜在重要的治疗化合物的毒性。改进药物可行性的策略是利用水溶性聚合物。已显示各种水溶性聚合物可改变生物分布、改进细胞摄取方式、通过生理屏障改变通透性；并改变从机体清除的速率。为了达到靶向或持续释放的效果，已经合成了水溶性聚合物，其含有药物部分作为末端基团、作为骨架的一部分或作为聚合物链上的侧基。鉴于其高度的生物相容性和易于修饰，聚乙二醇(PEG)已被广泛用作药物载体。已显示与各种药物、蛋白质和脂质体的附着可改进停留时间并降低毒性。PEG可以通过链末端的羟基和其他化学方法与活性剂偶联；但是，PEG本身每个分子限于最多两种活性剂。以另一种途径，将PEG和氨基酸的共聚物作为新型生物材料进行了探索，该材料将保留PEG的生物相容性，但具有每个分子众多附着点的附加优点(提供更大的载药量)，并且可以合成设计为适合各种应用。

[0052] 在一些实施方案中，促进DBI表达的试剂是编码如上所述的多肽的核酸分子。如本文所用，术语“核酸分子”具有其在本领域的一般含义，并且是指DNA或RNA分子。但是，该术语捕获包括DNA和RNA的任何已知碱基类似物的序列，诸如但不限于4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、叠氮基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基-氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基伪尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基尿嘧啶、5’-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、氧丁氧嘧啶、假尿嘧啶、奎宁、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、假尿嘧啶、奎宁、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0053] 在一些实施方案中，核酸分子包含与SEQ ID NO:2具有至少50％同一性的核酸序列。根据本发明，与第二核酸序列具有至少50％同一性的第一核酸序列是指第一序列与第二核酸序列具有50;51;52;53;54;55;56;57;58;59;60;61;62;63;64;65;66;67;68;69;70;71;72;73;74;75;76;77;78;79;80;81;82;83;84;85;86;87;88;89;90;91;92;93;94;95;96;97;98;99或100％同一性。

[0054] 在一些实施方案中，本发明的核酸分子包含在合适的载体中，诸如质粒、粘粒、附加体、人工染色体、噬菌体或病毒载体。典型地，载体是病毒载体，其是腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、牛乳头瘤病毒、腺病毒载体、慢病毒载体、牛痘病毒、多瘤病毒或感染性病毒。在一些实施方案中，载体是AAV载体。如本文所用，术语“AAV载体”是指衍生自腺相关病毒血清型的载体，包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9及其突变形式。AAV载体可具有全部或部分缺失的一个或多个AAV野生型基因，优选是rep和/或cap基因，但保留功能性ITR侧翼序列。由于逆转录病毒具有将其基因整合到宿主基因组中，转移大量外来遗传物质，感染广谱的物种和细胞类型并包装在特定细胞系中的能力，因此可以选择逆转录病毒作为基因递送载体。为了构建逆转录病毒载体，将编码目标基因的核酸代替某些病毒序列插入病毒基因组中，以产生复制缺陷型病毒。为了产生病毒体，构建了含有gag、pol和/或env基因但没有LTR和/或包装组分的包装细胞系。当将含有cDNA的重组质粒以及逆转录病毒LTR和包装序列引入该细胞系时(例如通过磷酸钙沉淀)，该包装序列允许

将重组质粒的RNA转录物包装成病毒颗粒，然后被分泌到培养基中。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基，任选地浓缩，并用于基因转移。逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型。慢病毒是复杂的逆转录病毒，除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外，其还含有其他具有调节或结构功能的基因。较高的复杂性使病毒能够调节其生命周期，如在潜在感染的过程中。慢病毒的一些实例包括人类免疫缺陷病毒(HIV 1、HIV 2)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。慢病毒载体是通过多重减毒HIV毒力基因而产生的，例如，基因env、vif、vpr、vpu和nef被删除，从而使该载体在生物学上是安全的。慢病毒载体是本领域已知的，参见例如美国专利第6,013,516号和第5,994,136号，两者均通过引用并入本文。通常，载体是基于质粒或基于病毒的，并且配置为携带用于掺入外来核酸、用于选择以及用于将核酸转移到宿主细胞中的必需序列。目标载体的gag、pol和env基因在本领域中也是已知的。因此，将相关基因克隆到选择的载体中，然后用于转化目标靶细胞。其中合适的宿主细胞用两种或更多种携带包装功能的载体(即gag、pol和env以及rev和tat)转染的能够感染非分裂细胞的重组慢病毒描述于通过引用并入本文的美国专利第5,994,136号中。其描述了可以提供编码病毒gag和pol基因的核酸的第一载体和可以提供编码病毒env的核酸的另一种载体以产生包装细胞。将提供异源基因的载体引入该包装细胞产生了生产细胞，该生产细胞释放出携带目标外源基因的感染性病毒颗粒。env优选是双嗜性包膜蛋白，其允许转导人和其他物种的细胞。典型地，本发明的核酸分子或载体包括“控制序列”，其统称为启动子序列、聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节域、复制起点、内部核糖体进入位点(“IRES”)、增强子等，它们共同在受体细胞中提供编码序列的复制、转录和翻译。只要选择的编码序列能够在合适的宿主细胞中复制、转录和翻译，并非总是需要所有这些控制序列。另一核酸序列是“启动子”序列，其在本文中以其通常的含义使用，其是指包含DNA调节序列的核苷酸区域，其中所述调节序列衍生自能够结合RNA聚合酶并能够启动下游(3’方向)编码序列的转录的基因。转录启动子可以包括“诱导型启动子”(其中可操作地连接至该启动子的多核苷酸序列的表达由分析物、辅因子、调节蛋白等诱导)，“抑制型启动子”(其中可操作地连接至该启动子的多核苷酸序列的表达由分析物、辅因子、调节蛋白等诱导)和“组成型启动子”。

[0055] 在一些实施方案中，促进DBI的活性的试剂是模拟DBI的活性的有机小分子或拟肽。如本文所用，术语“有机小分子”是指大小与通常在药物中使用的有机分子相当的分子。该术语不包括生物大分子(例如蛋白质、核酸等)。优选的有机小分子的大小范围为至多约5000Da，更优选至多2000Da，和最优选至多约1000Da。如本文所用，术语“拟肽”是指其基本元素(药效团)模拟3D空间中的天然肽或蛋白质并且其保留与生物靶标相互作用并产生相同生物效应的能力的任何分子。拟肽包括设计成模拟肽的小蛋白样链，其典型地可通过修饰现有肽或通过设计模拟肽(诸如类肽和β-肽)的类似系统而获得。不管采用哪种方法，改变的化学结构都被设计为有利地调节分子特性，例如，稳定性或生物活性增加或降低。根据涉及肽的改变的修饰(其将不会天然发生)包括但不限于骨架改变和非天然氨基酸的掺入。如本文所用，术语“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化合物。

[0056] 刺激自噬的方法：

[0057] 因此，本发明的第一目的涉及一种在有需要的受试者中刺激自噬的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的抑制DBI的活性或表达的试剂。

[0058] 在一些实施方案中，根据本发明的刺激自噬的方法特别适合于抑制食欲并因此体重减轻。所述方法还特别用于降低血糖和脂肪生成。因此，本发明的方法特别适用于治疗如下文所述的各种疾病。

[0059] 在一些实施方案中，受试者超重。特别地，所述受试者肥胖。肥胖是指健康受试者的BMI大于或等于30kg/m^2的情况，或具有至少一种合并症的受试者的BMI大于或等于27kg/m^2的情况。“肥胖受试者”是BMI大于或等于30kg/m^2的健康受试者，或BMI大于或等于27kg/m^2的具有至少一种合并症的受试者。“具有肥胖风险的受试者”是BMI为25kg/m^2至小于30kg/m^2的健康受试者，或BMI为25kg/m^2至小于27kg/m^2的具有至少一种合并症的受试者。与肥胖相关的风险增加可能在BMI较低的亚洲人后裔中发生。在亚洲和亚太国家(包括日本)中，“肥胖”是指受试者的BMI大于或等于25kg/m^2的情况。在这些国家中，“肥胖受试者”是指BMI大于或等于25kg/m^2的患有至少一种肥胖引起的或与肥胖相关的合并症的受试者，其需要减轻体重或可以通过减轻体重来改进。在这些国家中，“具有肥胖风险的受试者”是指BMI大于23kg/m^2至小于25kg/m^2的人。

[0060] 在一些实施方案中，所述受试者患有2型糖尿病。如本文所用，术语“2型糖尿病”或“非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)”具有本领域的一般含义。当胰岛素水平正常或甚至升高时，通常会发生2型糖尿病，这似乎是由于组织无法对胰岛素做出适当响应而导致的。大多数2型糖尿病患者肥胖。

[0061] 在一些实施方案中，受试者患有代谢综合征。如本文所用，术语“代谢综合征”是指特征在于具有以下三个或更多个症状的受试者：腹部肥胖、高甘油血症、低HDL胆固醇、高血压和高空腹血糖。这些症状的标准在国家胆固醇教育计划专家小组关于成人高血胆固醇的检测、评估和治疗的第三次报告中定义(Ford,E S.et al.2002)。

[0062] 在一些实施方案中，所述受试者患有癌症。尽管尚未阐明其潜在机制，但已显示化疗前的饥饿(能够全身诱导自噬的最有效的自噬诱导生理刺激)显著提高了治疗功效并限制了肿瘤生长。此外，已经证明具有PI3K过度活化的肿瘤对饮食限制具有抗性，这表明自噬在化学增敏过程中的重要作用。基于本发明试剂的按时施用，本发明可导致较低攻击性和等效的治疗。因此，本发明的另一目的涉及一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本发明的试剂和治疗有效量的化疗剂，其中在化疗剂之前施用本发明的试剂。在一些实施方案中，在施用化疗剂之前12;13;14;15;16;17;18;19;20;21;22;23;24;25;26;27;28;29;30;31;32;33;34;35;36;37;38;39;40;41;42;43;44;45;46;47;48;49;50;51;52;53;54;55;56h施用本发明的试剂。化疗剂包括但不限于烷基化剂，诸如噻替帕和环磷酰胺;烷基磺酸盐，诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶，诸如苯唑多巴、卡巴醌、米特多巴和尤利多巴;伸乙基亚胺和甲基密胺，包括六甲蜜胺、三伸乙基密胺、三伸乙基磷酰胺、三伸乙基硫代磷酰胺和三羟甲密胺;多聚乙酰(尤其是布拉他辛和布拉他辛酮);喜树碱(包括合成类似物拓朴替康)、苔藓虫素;卡利斯塔叮;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻环肽(特别是念珠藻环肽1和念珠藻环肽8);海兔毒素;多卡米辛(包括合成类似物，KW-2189和CB1-TM1);艾榴素;盘克斯塔叮;沙考的汀;海绵素;氮芥类，诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、二氯甲二乙胺、盐酸二氯甲二乙胺氧化物、美法仑、新氮芥、胆固醇苯乙酸氮芥、松龙苯芥、氯乙环磷酰胺、尿嘧啶氮芥;硝基脲，诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和拉宁司

汀;抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如,卡奇霉素,尤其是卡奇霉素γ1和卡奇霉素ω1;达米辛,包括达米辛A;二膦酸盐,诸如氯膦酸盐;艾斯帕米辛;以及新制癌菌素发色团及相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、克拉斯米辛、放线菌素、奥斯拉米辛、重氮丝胺酸、博莱霉素、放线菌素C、卡拉比辛、洋红霉素、嗜癌霉素、克罗米辛、放线菌素D、道诺霉素、地托比星、6-重氮基-5-侧氧-L-正白胺酸、阿霉素(包括吗啉并-阿霉素、氰基吗啉并-阿霉素、2-吡咯并-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、埃达霉素、麻西罗霉素、丝裂霉素(诸如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泼非霉素、嘌呤霉素、奎那霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,诸如甲胺蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如倭诺特呤、甲胺蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如环胞苷、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿核苷;雄激素,诸如二甲睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺剂,诸如胺基苯乙哌啶酮、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如夫罗林酸;醋葡内酯;醛磷酰胺葡糖苷;胺基乙酰丙酸;伊利卢拉;胺苯吖啶;倍思塔布;比生群;埃达曲克;得弗伐胺;秋水仙胺;地吖醌;艾弗利散;依利醋铵;埃坡霉素;乙环氧啶;硝酸镓;羟基脲;香菇糖;罗尼达宁;美登素,诸如美登素和胺沙托辛;丙脒腙;米托蒽醌;莫比达摩;硝拉维林;喷司他丁;凡那明;比柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;普鲁苄肼;PSK多醣复合物;丙亚胺;根霉菌素;西佐糖;螺锗;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2″-三氯三乙基胺;单端孢霉烯族毒素(尤其是T-2毒素、弗纳库林A、杆孢菌素A和胺癸叮);乌拉坦;去乙酰长春酰胺;氮烯唑胺;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;双溴丙基哌嗪;甲托辛;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷,例如紫杉醇和多西他赛;苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲胺蝶呤;铂配合物,诸如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺凡特龙;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸;伊立替康(例如CPT-1 1);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟胺酸(DMFO);类视色素,诸如视黄酸;卡培他滨以及任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0063] 在一些实施方案中,所述受试者患有神经退行性疾病。神经退行性疾病的实例包括但不限于肾上腺髓质营养不良(ALD)、亚历山大氏病、阿尔珀氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(Lou Gehrig氏病)、共济失调性毛细血管扩张症、Batten病(也称为Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Batten病)、牛海绵状脑病(BSE)、Canavan病、Cockayne综合征、皮质基底变性、Creutzfeldt-Jakob病、额颞叶变性、亨廷顿氏病、HIV相关性痴呆、肯尼迪病、Krabbe病、路易体痴呆、神经莱姆病、Machado-Joseph性病(3型脊髓小脑共济失调)、MELAS-线粒体脑病、乳酸酸中毒和中风、多系统萎缩、多发性硬化、Niemann Pick病、帕金森氏病、Pelizaeus-Merzbacher病、Pick病、原发性侧索硬化、朊病毒病、进行性超核性麻痹、Refsum病、Sandhoff病、Schilder病、脊髓小脑性共济失调(多种类型,特征各异)、脊髓性肌萎缩症、Steele-Richardson-Olszewski病、脊髓痨、Tay-Sachs病和中毒性脑病。优选的神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病。神经退行性疾病(即阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿病)是一系列不同的年龄依赖性或遗传依赖性疾病,其特征是由于错误折叠的蛋白质聚集体的积聚、细胞器受损、细胞清除机制的功能受损而导致的进行性神经元死亡。由于自噬是致力于降解潜在有害和易于聚集的长寿蛋白质以及回收受损细胞器的生理机制,因此

其被认为是防止神经元细胞死亡的保护因子。在本发明的上下文中，用本发明的试剂治疗患者可导致细胞清除功能的改进和不同疾病的症状的改进。例如，亨廷顿病是一种以亨廷顿蛋白的聚谷氨酰胺尾逐渐扩展，导致其在神经内的聚集为特征的病理。已经证实亨廷顿蛋白是自噬途径的特定靶标，并且通过施用本发明的试剂增加基础自噬可以降低神经元死亡的速率。在熟悉的帕金森氏病的两种形式中，参与线粒体自噬的编码PINK1和PARK2的两个基因的隐性突变部分地解释了这种疾病的发病机理，并可使患者适合于用本发明的试剂治疗。以同样的方式，自噬诱导可有助于去除α-突触核蛋白聚集体(路易体)(其是散发性帕金森氏病发病机理的原因，很可能是由于自噬系统饱和所致)。

[0064] 在一些实施方案中，所述受试者患有感染性疾病。自噬过程积极参与了针对微生物的多管齐下的防御，通过将微生物选择性地递送至降解的溶酶体(称为异体吞噬的过程)或通过将微生物核酸递送至溶酶体腔室(随后激活先天和适应性免疫)而有助于消除微生物。临床相关的病原体通过异体吞噬在体外被降解；其中存在细菌，诸如化脓性链球菌A群、结核分枝杆菌、弗氏志贺氏菌、肠沙门氏菌、单核细胞增生性李斯特菌；病毒，诸如1型单纯疱疹病毒(HSV 1)和寄生虫，诸如弓形虫。此外，体内证据表明自噬基因对多种病原体具有保护作用，包括单核细胞增生性李斯特菌、结核分枝杆菌、肠沙门氏菌、弓形虫、HSV1。最近已表明由诸如志贺氏菌和沙门氏菌等病原体介导的感染引发氨基酸饥饿应答，最终导致通过自噬消除这些病原体。在此，本发明的试剂用于引发针对细菌和病毒感染的自噬和抗微生物应答的用途可能是合适的。

[0065] 在一些实施方案中，受试者患有肺气肿。蛋白α1-抗胰蛋白酶的突变会引起肺气肿，这种疾病的特征在于突变蛋白的聚集形式的积聚。至于其他蛋白病，通过施用本发明的试剂(例如，HC、UK-5099)诱导自噬可以减轻症状。

[0066] 在一些实施方案中，所述受试者患有囊性纤维化。最近的临床前研究发现，由于功能紊乱的聚集体自噬，导致突变体CTFR聚集体清除能力受损，导致囊性纤维化的致病性。通过施用本发明的试剂介导的自噬诱导可以代表合适的策略。

[0067] 在一些实施方案中，受试者患有肝病。从肝脏研究中发现了自噬在体内的潜在影响，这突显了自噬在肝脏生理中的重要作用。

[0068] 因此，本发明的另一个目的涉及在其受试者中治疗非酒精性脂肪肝疾病的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的抑制DBI的活性或表达的试剂。

[0069] 如本文所用，术语“非酒精性脂肪肝疾病”或“NAFLD”具有其在本领域中的一般含义，并且是指当脂肪沉积于肝脏而不是由于过度饮酒而引起时发生的脂肪肝的一种病因。非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)尤其是在肥胖和糖尿病患者中代表最常见和最严重的病理之一，但还远没有一种可用的具体疗法。NAFLD被定义为肝脏中脂肪的积聚，但不是酒精摄入的次要结果。本发明试剂的促自噬能力可用于不同病因的NAFLD的治疗：TG液滴的选择性降解(脂吞噬作用)、脂生成途径的抑制(即BTC抑制柠檬酸盐从线粒体输出)。相反，自噬诱导剂哌克昔林在ALD中起适应性和保护性作用，在乙醇中毒后赋予肝细胞保护作用并抑制脂肪细胞分化。

[0070] NAFLD可被亚分类为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和非酒精性脂肪肝(NAFL)。非酒精性脂肪肝(NAFL)是NAFLD的一种，且是脂肪在肝细胞中积聚的病症。NAFL发展为肝硬化的风险极小。非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是NAFLD的更为极端的形式，被认为是病因不明的肝

纤维化和肝硬化的主要原因。NASH的主要特征是肝脏中的脂肪以及炎症和损害。NASH可以很严重，并可能导致纤维化和肝硬化，其中肝脏被永久性损伤和伤痕化，并且无法再正常工作。大多数NAFLD患者很少或没有症状。患者可能会抱怨疲劳、心神不宁和右上腹部隐隐不适。尽管很少见，但可能会出现轻度黄疸。因此，NAFLD的并发症典型地包括肝纤维化和随后的肝硬化。肝纤维化的特征是可以从质量上区别于正常肝脏的细胞外基质的积聚。如果不检查，肝纤维化会发展为肝硬化(由包囊结节的存在所定义)、肝和器官衰竭以及死亡。

[0071] 在一些实施方案中，抑制DBI的活性或表达的试剂特别适合于治疗NASH。

[0072] 在一些实施方案中，受试者患有胰腺炎，其是外分泌胰腺的炎性疾病，最终导致腺泡细胞大量坏死性细胞死亡。尽管促进这种病理的机制仍不清楚，但是在该病理过程中自噬受到损害这一观点上已达成共识。腺泡细胞的特征在于大的自噬体不能变成自噬溶酶体，这主要归因于溶酶体蛋白(即LAMP2)的耗尽。此外，最近已经表明，Ikkα的缺失抑制了自噬通量并促进了p62-阳性蛋白聚集体的形成，从而促进疾病的发作。此外，在疾病的急性期，称为“酶自噬(zymophagy)”的选择性自噬过程防止腺泡细胞通过有害活化酶原颗粒的降解而死亡。可以测试本发明的试剂(诸如羟基柠檬酸)引发酶自噬的能力。此外，这些试剂单独或与溶酶体靶向疗法联合，可适合于通过恢复正常的自噬通量来改善疾病的症状。

[0073] 在一些实施方案中，所述受试者患有蛋白病。通过使用本发明的试剂诱导自噬可特别适合于治疗蛋白病。蛋白质病的实例包括但不限于阿尔茨海默氏病、脑β-淀粉样血管病、视网膜神经节细胞变性、朊病毒病(例如牛海绵状脑病、库鲁病、克雅氏病、变异型克雅氏病、Gerstmann-Straussler-Scheinker综合征、致命的家族性失眠症)、Tau蛋白病(例如额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、进行性核上性麻痹、皮质基底膜变性、额颞叶大叶变性)、额叶大叶变性、肌萎缩性侧索硬化、亨廷顿病、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、遗传性脑出血并伴淀粉样变性(Icelandic)、CADASIL、亚历山大病、Seipinopathies、家族性淀粉样变性神经病、老年性系统性淀粉样变性、serpinopathies、AL淀粉样变性、AA淀粉样变性、II型糖尿病、主动脉内侧淀粉样变性、ApoAI淀粉样变性、ApoII淀粉样变性、ApoAIV淀粉样变性、Finish型家族性淀粉样变性、溶菌酶淀粉样变性、纤维蛋白原淀粉样变性、透析淀粉样变性、包涵体肌炎/肌病、白内障、甲状腺髓样癌、心脏房性淀粉样变性、垂体泌乳素瘤、遗传性点状角膜营养不良、苔藓样皮肤淀粉样变性、角膜乳铁蛋白淀粉样变性、角膜乳铁蛋白淀粉样变性、肺泡蛋白沉积症、牙源性肿瘤淀粉样变性、储精囊淀粉样变性、囊性纤维化、镰状细胞病和重症肌病。

[0074] 抑制DBI的活性或表达的试剂：

[0075] 在一些实施方案中，抑制DBI活性的试剂是针对DBI的抗体。

[0076] 因此，如本文所用，术语“抗体”用于指具有抗原结合区的任何抗体样分子，并且该术语包括抗体片段，该抗体片段包含抗原结合结构域，诸如Fab'、Fab、F(ab')2、单域抗体(DAB)、TandAbs二聚体、Fv、scFv(单链Fv)、dsFv、ds-scFv、Fd、线性抗体、微型抗体、双抗体、双特异性抗体片段、二抗体、三抗体(scFv-Fab融合蛋白，分别是双特异性或三特异性)、sc-双抗体、κ(λ)体(scFv-CL融合体)、BiTE(双特异性T细胞衔接器、吸引T细胞的scFv-scFv串联)、DVD-Ig(双可变域抗体，双特异性格式)、SIP(小免疫蛋白，一种微型抗体)、SMIP(“小型模块化免疫药物”scFv-Fc二聚体、DART(ds稳定的双抗体“Dual Affinity ReTargeting”)；包含一个或多个CDR的小抗体模拟物等。制备和使用各种基于抗体的构建体和片段的技术

是本领域众所周知的(参见Kabat et al.,1991,其具体地通过引用并入本文)。具体地,双抗体进一步描述于EP 404,097和WO 93/1 1 161中;而线性抗体进一步描述于Zapata et al.(1995)中。可以使用常规技术将抗体片段化。例如,可以通过用胃蛋白酶处理抗体来产生F(ab')2片段。可以处理所得的F(ab')2片段以还原二硫键以产生Fab'片段。木瓜蛋白酶消化可导致Fab片段的形成。Fab、Fab'和F(ab')2、scFv、Fv、dsFv、Fd、dAbs、TandAbs、ds-scFv、二聚体、微型抗体、双抗体、双特异性抗体片段和其他片段也可以通过重组技术合成或可以化学合成。产生抗体片段的技术是众所周知的,并且描述于本领域中。例如Beckman et al.,2006;Holliger&Hudson,2005;Le Gall et al.,2004;Reff&Heard,2001;Reiter et al.,1996;和Young et al.,1995中的每一个进一步描述并使有效抗体片段的产生成为可能。在一些实施方案中,本发明的抗体是单链抗体。如本文所用,术语"单结构域抗体"具有其在本领域中的一般含义,并且是指可以在骆驼属哺乳动物中发现的天然缺乏轻链的类型的抗体的单重链可变结构域。这种单结构域抗体也被称为"纳米抗体(nanobody®)"。对于(单)结构域抗体的一般描述,还参考以上引用的现有技术,以及EP 0 368 684,Ward et al.(Nature 1989Oct 12;341(6242):544-6),Holt et al.,Trends Biotechnol.,2003,21(11):484-490;和WO 06/030220、WO 06/003388。在天然抗体中,两条重链通过二硫键相互连接,并且每条重链通过二硫键与轻链连接。存在两种类型的轻链,lambda(1)和kappa(κ)。存在五个主要的重链类别(或同种型),其决定抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每条链含有不同的序列结构域。轻链包括两个结构域,可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)。重链包括四个结构域,可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3,统称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)的可变区决定了对抗原的结合识别和特异性。轻链(CL)和重链(CH)的恒定区结构域赋予重要的生物学性能,诸如抗体链结合、分泌、经胎盘移动、补体结合和与Fc受体(FcR)结合。Fv片段是免疫球蛋白的Fab片段的N-末端部分,并且由一条轻链和一条重链的可变部分组成。抗体的特异性在于抗体结合位点和抗原决定簇之间的结构互补性。抗体结合位点由主要来自高变区或互补决定区(CDR)的残基组成。偶尔,来自非高变区或框架区(FR)的残基可参与抗体结合位点或影响整个结构域的结构并因此影响结合位点。互补决定区或CDR是指一起定义天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各自具有三个CDR,分别称为L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3和H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。因而,抗原结合位点典型地包括六个CDR,其包含来自重链和轻链V区的每一个的CDR组。框架区(FR)是指插入CDR之间的氨基酸序列。抗体可变结构域中的残基通常根据Kabat等设计的系统编号。该系统列于Kabat et al.,1987的Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Department of Health and Human Services,NIH,USA(以下简称"Kabat等")中。在本说明书中使用该编号系统。Kabat残基的名称并不总是直接与SEQ ID序列中氨基酸残基的线性编号相对应。实际的线性氨基酸序列可以含有比在严格的Kabat编号中更少或额外的氨基酸,其对应于基本可变结构域结构的结构成分(无论框架或互补决定区(CDR))的缩短或插入。可以通过将抗体序列中的同源残基与"标准"Kabat编号序列进行比对,来确定给定抗体的残基的正确Kabat编号。根据Kabat编号系统,重链可变结构域的CDR位于残基31-35B(H-CDR1)、残基50-65(H-CDR2)和残基95-102(H-CDR3)。根据Kabat编号系统,轻链可变结构域的CDR位于残基24-34(L-CDR1)、残基50-56(L-CDR2)和残基89-97(L-CDR3)。

[0077] 在一些实施方案中，该抗体针对由第43位的氨基酸残基至第50位的氨基酸残基的氨基酸序列组成(即八肽或OP)的片段。

[0078] 在一些实施方案中，本发明的抗体是嵌合抗体，典型地是嵌合小鼠/人抗体。术语“嵌合抗体”是指单克隆抗体，其包含衍生自非人动物的抗体的VH结构域和VL结构域、人抗体的CH结构域和CL结构域。作为非人动物，可以使用任何动物，诸如小鼠、大鼠、仓鼠、兔等。特别地，所述小鼠/人嵌合抗体可以包含本发明抗体的重链和轻链。

[0079] 在一些实施方案中，抗体是人源化抗体。如本文所用，“人源化”描述了其中CDR区外的一些、大部分或全部氨基酸被衍生自人免疫球蛋白分子的相应氨基酸替代的抗体。人源化方法包括但不限于美国专利号4,816,567、5,225,539、5,585,089、5,693,761、5,693,762和5,859,205中描述的那些，它们通过引用并入本文。

[0080] 在一些实施方案中，抗体是完全人抗体。也可以通过免疫大部分人免疫球蛋白重链和轻链基因座的转基因小鼠来制备完全人单克隆抗体。例如，参见美国专利号5,591,669、5,598,369、5,545,806、5,545,807、6,150,584和其中引用的参考文献，它们的内容通过引用并入本文。

[0081] 在一些实施方案中，抗体是中和抗体。如本文所用，术语“中和抗体”是抑制、降低或完全消除DBI活性的抗体。可以通过实施例中描述的体外测定来确定抗体是否为中和抗体。典型地，本发明的中和抗体将DBI的活性抑制至少50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或100％。

[0082] 在一些实施方案中，本发明的中和抗体不介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性，因此不包含诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的Fc部分。在一些实施方案中，中和抗体不包含能够基本上结合FcgRIIIA(CD16)多肽的Fc结构域。在一些实施方案中，中和抗体缺乏Fc结构域(例如，缺乏CH2和/或CH3结构域)或包含IgG2或IgG4同种型的Fc结构域。在一些实施方案中，中和抗体由Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2、Fv、双抗体、单链抗体片段或包含多个不同抗体片段的多特异性抗体组成，或包含Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)2、Fv、双抗体、单链抗体片段或包含多个不同抗体片段的多特异性抗体。在一些实施方案中，中和抗体不与毒性部分连接。在一些实施方案中，选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基替代，使得抗体已经改变C2q结合和/或减少或消除了补体依赖性细胞毒性(CDC)。在ldusogie等人的美国专利号6,194,551中进一步详细描述了这种方法。

[0083] 在一些实施方案中，抑制DBI活性的试剂是针对DBI的适配子。适配子是在分子识别方面代表抗体的替代物的一类分子。适配子是寡核苷酸序列，具有以高亲和力和特异性识别实际上任何类型的靶分子的能力。可通过随机序列文库的指数富集(SELEX)通过配体的系统进化来分离此类配体。可通过DNA的组合化学合成获得随机序列文库。在该文库中，每个成员都是唯一序列的最终经过化学修饰的线性低聚物。肽适配子由通过两种杂交方法从组合文库中选择的平台蛋白(例如大肠杆菌硫氧还蛋白A)展示的受构象约束的抗体可变区组成(Colas等，1996)。

[0084] 在一些实施方案中，抑制DBI表达的试剂是表达抑制剂。“表达抑制剂”是指具有抑制基因表达的生物学作用的天然或合成化合物。在本发明的优选实施方案中，所述基因表达抑制剂是siRNA、核酸内切酶、反义寡核苷酸或核酶。

[0085] 在一些实施方案中，表达抑制剂是siRNA。小抑制性RNA(siRNA)也可以用作表达抑

制剂以用于本发明。可通过使患者或细胞与小双链RNA(dsRNA)或引起小双链RNA产生的载体或构建体接触来降低DBI基因表达,从而特异性抑制DBI基因表达(即RNA干扰或RNAi)。

[0086] 在一些实施方案中,表达抑制剂是核酸内切酶。术语"核酸内切酶"是指在多核苷酸链内切割磷酸二酯键的酶。一些,诸如脱氧核糖核酸酶I,相对非特异性地切割DNA(不考虑序列),而许多典型地称为限制性核酸内切酶或限制性酶,仅在非常特定的核苷酸序列处切割。基于核酸内切酶的基因组失活背后的机制通常需要DNA单链或双链断裂的第一步,然后其能够触发DNA修复的两种不同细胞机制,这些机制可以用于DNA失活:易于出错的非同源末端连接(NHEJ)和高保真同源介导的修复(HDR)。在一个具体实施方案中,核酸内切酶是CRISPR-Cas。如本文所用,术语"CRISPR-Cas"具有其在本领域的一般含义,并且是指簇状规则间隔的短回文重复序列,其是含有短重复碱基序列的原核DNA片段。在一些实施方案中,核酸内切酶是CRISPR-cas9,其来自酿脓链球菌。CRISPR/Cas9系统已描述于US 8697359B1和US 2014/0068797中。在一些实施方案中,核酸内切酶是CRISPR-Cpf1,其是来自Zetsche等中的Provotella和Francisella1(Cpf1)的最近表征的CRISPR("Cpf1 is a Single RNA-guided Endonuclease of a Class 2CRISPR-Cas System(2015);Cell;163,1-13)。

[0087] 在一些实施方案中,表达抑制剂是反义寡核苷酸。术语"反义寡核苷酸"是指相对于其正常转录方向而言是反向的寡核苷酸序列,因此表达与宿主细胞内表达的靶基因mRNA分子互补的RNA转录物(例如,它可以通过Watson-Crick碱基配对与靶基因mRNA分子杂交)。反义链可以多种不同的方式构建,只要它能够干扰靶基因的表达。例如,可通过相对于转录的正常方向反转靶基因的编码区(或其一部分)来构建反义链,以允许转录其补体(例如,由反义和有义基因编码的RNA可能是互补的)。此外,反义寡核苷酸链不必具有与靶基因相同的内含子或外显子模式,并且靶基因的非编码区段与编码区段可以在实现靶基因表达的反义抑制方面同样有效。如本文所用,术语"寡核苷酸"是指3'-5'或5'-3'方向的核酸序列,其可以是单链或双链的。特别地,在本发明的上下文中使用的反义寡核苷酸可以是DNA或RNA。根据本发明,本发明的反义寡核苷酸靶向编码DBI的mRNA(例如SEQ ID NO:2),并且能够减少细胞中DBI的量。如本文所用,"靶向"mRNA的寡核苷酸是指能够特异性结合所述mRNA的寡核苷酸。也就是说,反义寡核苷酸包含与所述mRNA序列的区域至少部分互补、优选完全互补的序列,所述互补性足以在细胞内条件下产生特异性结合。如对本领域技术人员而言立即显而易见的,与第二序列"完全互补"的序列是指DNA分子形式或RNA分子形式的第二序列的反向互补的配对物。如果存在一个或多个错配,则一个序列与第二序列"部分互补"。可以通过用所述mRNA的序列为基础(例如使用生物信息学工具)设计本发明的靶向编码DBI的mRNA的反义寡核苷酸。例如,SEQ ID NO:2的序列可以用作设计靶向编码DBI的mRNA的核酸的基础。优选地,根据本发明的反义寡核苷酸能够减少细胞中(例如癌细胞中)DBI的量。确定寡核苷酸是否能够减少细胞中DBI量的方法是本领域技术人员已知的。例如,这可以通过以下方法完成:通过Western印迹分析DBI蛋白表达,并且通过比较在存在和不存在待测试的反义寡核苷酸的情况下的DBI蛋白表达。在一些实施方案中,本发明的反义寡核苷酸的长度为12-50个核苷酸,例如12-35个核苷酸,12-30、12-25、12-22、15-35、15-30、15-25、15-22、18-22或约19、20或21个核苷酸。例如,根据本发明的反义寡核苷酸可以包含12-50个连续的核苷酸或由12-50个连续的核苷酸组成,例如12-35、12-30、12-25、12-22、15-35、15-30、15-25、15-22、18-22或约19、20或21个与SEQ ID NO:2的mRNA互补的序列的连续核苷酸。在一些

实施方案中，本发明的反义寡核苷酸被进一步修饰，优选化学修饰，以增加反义寡核苷酸在体内的稳定性和/或治疗功效。特别地，在本发明的上下文中使用的反义寡核苷酸可以包含修饰的核苷酸。化学修饰可发生在三个不同的位点：(i)在磷酸基团上，(ii)在糖部分上，和/或(iii)在反义寡核苷酸的整个主链结构上。例如，反义寡核苷酸可以用作具有增强的耐核酸酶消化的硫代磷酸酯衍生物(用硫原子代替非桥连的磷酰基氧原子)。2'-甲氧基乙基(MOE)修饰(诸如由ISIS Pharmaceuticals商业化的修饰骨架)也有效。另外地或可替代地，本发明的反义寡核苷酸可完全、部分或组合地包含修饰的核苷酸，所述修饰的核苷酸是在糖的2'位具有取代的衍生物，特别是具有以下化学修饰的衍生物：O-甲基(2'-O-Me)取代、2-甲氧基乙基(2'-O-MOE)取代、氟基(2'-氟)取代、氯基(2'-Cl)取代、溴基(2'-Br)取代、氰化物基团(2'-CN)取代、三氟甲基(2'-CF3)取代、OCF3基(2'-OCF3)取代、OCN基(2'-OCN)取代、O-烷基(2'-O-烷基)取代、S-烷基(2'-S-烷基)取代、N-烷基(2'-N-烷基)取代、O-烯基(2'-O-烯基)取代、S-烯基(2'-S-烯基)取代、N-烯基(2'-N-烯基)取代、SOCH3基(2'-SOCH3)取代、SO2CH3基(2'-SO2CH3)取代、ONO2基(2'-ONO2)取代、NO2基(2'-NO2)取代、N3基(2'-N3)取代和/或NH2基(2'-NH2)取代。另外地或可替代地，本发明的反义寡核苷酸可包含完全或部分修饰的核苷酸，其中核糖部分用于产生锁核酸(LNA)，其中在核糖的2'氧和4'碳之间形成共价桥，将其固定为3'-内构型。这些构建体在生物介质中极其稳定，能够激活RNase H并与互补的RNA和DNA形成紧密的杂合物。因此，在优选实施方案中，在本发明的上下文中使用的反义寡核苷酸包含选自下组的修饰的核苷酸：LNA、2'-OMe类似物、2'-硫代磷酸酯类似物、2'-氟类似物、2'-Cl类似物、2'-Br类似物、2'-CN类似物、2'-CF3类似物、2'-OCF3类似物、2'-OCN类似物、2'-O-烷基类似物、2'-S-烷基类似物、2'-N-烷基类似物、2'-O-烯基类似物、2'-S-烯基类似物、2'-N-烯基类似物、2'-SOCH3类似物、2'-SO2CH3类似物、2'-ONO2类似物、2'-NO2类似物、2'-N3类似物、2'-NH2类似物及其组合。更优选地，修饰的核苷酸选自下组：LNA、2'-OMe类似物、2'-硫代磷酸酯类似物和2'-氟类似物。在一些实施方案中，反义是三环-DNA反义。术语“三环-DNA(tc-DNA)”是指一类受限的寡脱氧核糖核苷酸类似物，其中每个核苷酸都通过引入环丙烷环进行修饰，以限制骨架的构象柔性并优化扭转角γ的骨架几何形状(Ittig D,et al.,Nucleic Acids Res,2004,32:346-353;Ittig D,et al.,Prague,Academy of Sciences of the Czech Republic.1:21-26(Coll.Symp.Series,Hocec,M.,2005);Ivanova et al.,Oligonucleotides 2007,17:54-65;Renneberg D,et al.,Nucleic Acids Res,2002,15 30:2751-2757;Renneberg D,et al.,Chembiochem,2004,5:1114-1118;和Renneberg D,et al.,JACS,2002,124:5993-6002)。具体地，tc-DNA核苷中心C(3′)和C(5′)之间的附加的乙烯桥而在结构上不同于DNA，环丙烷单元与所述中心融合以进一步增强结构刚度。例如，参见WO2010115993的三环-DNA(tc-DNA)反义寡核苷酸的实例。三环-DNA化学的优点是其主链的结构特性允许缩短AON的长度，同时保持与互补核苷酸序列的高亲和力和高度特异性杂交。出乎意料的是，tc-DNA AON可以有利地在体内使用肌内施用以微克剂量使用，其比常规反义寡核苷酸技术所需的剂量小至少十倍。另外，tc-DNA保留完整的活性，其中反义长度减少。因此，例如13-15个核苷酸的tc-DNA AON在本公开示例的离体和体内应用中是高度有效的。

[0088] 在一些实施方案中，抑制DBI活性的试剂在于适合于当向受试者施用时引发针对DBI的中和性自身抗体的疫苗组合物。为了本发明的目的，术语“疫苗组合物”是指可以向人

或动物施用以诱导免疫系统应答的组合物;这种免疫系统应答会导致产生针对DBI的抗体。典型地,疫苗组合物包含至少一种衍生自DBI的抗原。如本文所用,术语“抗原”是指通过由MHC分子加工并呈递的抗体或T细胞受体(TCR)能够特异性结合的分子。如本文所用,术语“抗原”还涵盖T细胞表位。抗原另外能够被免疫系统识别和/或能够诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答,从而导致B-和/或T-淋巴细胞的活化。抗原可以具有一个或多个表位或抗原位点(B-和T-表位)。在一些实施方案中,抗原在于包含与SEQ ID NO:1的序列或其片段具有至少80%同一性的氨基酸序列(例如表位)的多肽。在一些实施方案中,抗原在于一种多肽,所述多肽包含:i)与SEQ ID NO:1具有至少80%的同一性的氨基酸序列,或ii)与SEQ ID NO:1中第17位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或iii)与SEQ ID NO:1中第33位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或iv)与SEQ ID NO:1中第43位氨基酸残基至第50位氨基酸残基的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,该多肽与载体蛋白结合,该载体蛋白通常是足够外来的,以引起对疫苗的强免疫应答。示例性载体蛋白固有地是高度免疫原性的。牛血清白蛋白(BSA)和匙孔血蓝蛋白(KLH)两者在与动物进行实验时均通常已被用作结合疫苗开发中的载体,并在本文中被预期为载体蛋白。已用于制备治疗性结合疫苗的蛋白质包括但不限于多种致病细菌毒素及其类毒素。合适的载体分子很多,包括但不限于:细菌毒素或产物,例如霍乱毒素B-(CTB)、白喉毒素、破伤风类毒素和百日咳毒素和丝状血凝素、志贺毒素、假单胞菌外毒素;凝集素,例如蓖麻蛋白-B亚基、阿布林和甜豌豆凝集素;亚病毒,例如逆转录病毒核蛋白(逆转录NP)、狂犬病核糖核蛋白(狂犬病RNP)、植物病毒(例如TMV、豇豆和花椰菜花叶病毒)、水泡性口炎病毒核衣壳蛋白(VSV-N)、痘病毒载体和Semliki森林病毒载体;人工载体,例如多抗原肽(MAP)、微球;酵母病毒样颗粒(VLP);疟疾蛋白抗原;以及其他,诸如蛋白质和肽以及上述的任何修饰、衍生物或类似物。其他有用的载体包括具有增强粘膜反应能力的载体,更具体地,包括细菌毒素的LTB家族、逆转录病毒核蛋白(逆转录NP)、狂犬病核糖核酸蛋白(狂犬病RNP)、水泡性口炎病毒核衣壳蛋白(VSV-N)和重组pox病毒亚基。

[0089] 在一些实施方案中,本发明的疫苗组合物包含佐剂。术语“佐剂”可以是单独施用时缺乏显著活性但可以增强另一种治疗剂的活性的化合物。在一些实施方案中,佐剂为不完全弗氏佐剂(IFA)或其他基于油的佐剂,其以重量(w/w)比30-70%,优选40-60%,更优选45-55%存在。在一些实施方案中,本发明的疫苗组合物包含至少一种Toll样受体(TLR)激动剂,其选自下组:TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7和TLR8激动剂。其他佐剂包括细胞因子,诸如白介素(IL-1、IL-2和IL-12)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和肿瘤坏死因子(TNF)。在一个具体实施方案中,佐剂是具有佐剂性能的乳液。这样的乳液包括水包油乳液。弗氏不完全佐剂(IFA)就是这样一种佐剂。另一种合适的水包油乳液是MF59™佐剂,其含有角鲨烯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(也称为Tween™80表面活性剂)和脱水山梨糖醇三油酸酯。角鲨烯是一种最初从鲨鱼肝油中获得的天然有机化合物,尽管也可以从植物来源(主要是植物油)中获得,包括苋籽(amaranth seed)、米糠、小麦胚芽和橄榄。其他合适的佐剂是Montanide™佐剂(Seppic Inc.,Fairfield N.J.),包括Montanide™ISA 50V,其是基于矿物油的佐剂;Montanide™ISA 206和Montanide™IMS 1312。尽管矿物油可以存在于共佐剂中,但是在一些实施方案中,本文所述的组合物的油组分都是可代谢的油。

[0090] 药物组合物：

[0091] 以药物组合物的形式向受试者施用调节(即促进或抑制)DBI的活性或表达的试剂。典型地，本发明的试剂可以与药学上可接受的赋形剂和任选的持续释放基质(诸如生物可降解)的聚合物组合以形成治疗组合物。“药学上”或“药学上可接受”是指当视情况施用于哺乳动物(优选人)时，不产生不利、过敏或其他不良反应的分子实体或组合物。药学上可接受的载体或赋形剂是指任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂。在用于口服、舌下、皮下、肌内、静脉内、经皮、局部或直肠施用的本发明药物组合物中，单独或与另一种活性成分联合的活性成分可以以单位施用形式，如作为与常规药物载体的混合物，向受试者施用。合适的单位施用形式包括口服途径形式(诸如片剂、凝胶胶囊、粉末、颗粒和口服混悬液或溶液)、舌下和经颊施用形式、气雾剂、植入物、皮下、透皮、局部、腹膜内、肌内、静脉内、皮下、透皮、鞘内和鼻内施用形式以及直肠施用形式。典型地，药物组合物含有对于能够注射的制剂是药学上可接受的介质。特别地，这些可以是等渗的无菌盐溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或此类盐的混合物)，或干燥(尤其是冻干)的组合物，当视情况而定添加无菌水或生理盐水后，其允许配制可注射溶液。适用于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散体；包括芝麻油、花生油或丙二醇水溶液的制剂；以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下，该形式必须是无菌的并且必须是程度达到易于注射的流体。它必须在制备和储存条件下稳定，并且必须防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。包含本发明化合物作为游离碱或药学上可接受盐的溶液可以在适当地与表面活性剂(诸如羟丙基纤维素)混合的水中制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和油中制备。在普通的储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。本发明的试剂可以被配制成中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成)，其与无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)，和有机碱(如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。例如，载体也可以是溶剂或分散介质，其含有水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油。例如，通过使用诸如卵磷脂的包衣，在分散体的情况下通过保持所需的粒径并通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来防止微生物的作用。在许多情况下，优选包括等渗剂，例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以实现可注射组合物的延长吸收。通过将所需量的活性化合物与上文列举的若干其他成分(如果需要)加入适当的溶剂中，然后过滤灭菌，来制备无菌可注射溶液。通常，通过将各种灭菌的活性成分加入无菌载体中来制备分散体，所述无菌载体含有基础分散体介质和所需的来自上文列举的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，其从之前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。还预期制备更多或高度浓缩的溶液用于直接注射，其中设想使用DMSO作为溶剂会导致极快速渗透，从而将高浓度的活性剂递送到小的肿瘤区域。一旦配制，溶液将以与剂量制剂相容的方式并以治疗有效的量施用。制剂易于以多种剂型施用，诸如上述可注射溶液的类型，但也可采用药物释放胶囊等。例如，对于水溶液中的肠胃外施用，如果必要，溶液应适当缓冲，

并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适用于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。就此而言，根据本公开内容，可以采用的无菌水性介质对于本领域技术人员而言将是已知的。取决于所治疗的受试者的情况，剂量必然发生一些变化。在任何情况下，负责施用的人员将确定个体受试者的适当剂量。

[0092] 筛选方法：

[0093] 本发明的另一个目的涉及筛选适合于调节自噬的化合物的方法，包括：i)提供候选化合物，ii)测定所述候选化合物是否能够调节DBI的活性或表达，以及iii)正向选择所述能够调节DBI的活性或表达的候选化合物。

[0094] 根据本发明的一个实施方案，候选化合物可以选自之前合成的化合物的文库，或在数据库中确定了结构的化合物的文库，或选自从头合成的化合物或天然化合物的文库。候选化合物可以选自下组：(a)蛋白质或肽，(b)核酸和(c)有机或化学化合物(天然或非天然)。示例性地，可以通过进行如文献US 5,475,096和US 5,270,163中所述的SELEX方法获得预选的候选核酸的文库。在一些实施方案中，候选化合物是衍生自DBI的肽或DBI的拟肽。

[0095] 测试候选化合物是否可以调节DBI的活性或表达可以使用或常规改变本领域已知的测定法来测定。例如，该方法可以包括使表达DBI的细胞与候选化合物接触，并测量DBI介导的活性，并将细胞应答与标准细胞应答进行比较。典型地，在不存在候选化合物的情况下测量标准细胞应答。细胞应答低于标准表明所述候选化合物能够抑制DBI的活性。相反，高于标准的细胞应答表明候选化合物能够促进DBI的活性。在一些实施方案中，本发明提供用于鉴定与DBI受体特异性结合的配体的方法。例如，可以从表达与DBI受体结合的分子的细胞制备细胞隔室，诸如膜或其制剂。测定基因表达的方法在本领域也是众所周知的，且典型地是报告基因测定法(例如，在DBI基因启动子下表达核酸分子的细胞，或表达被可检测部分标记的DBI形式的细胞)或用于测定核酸水平表达的任何测定法(例如RT-PCR)。

[0096] 在一些实施方案中，考虑到进一步测定其在自噬上的性能(例如，借助于内源荧光生物传感器或外源荧光探针，诸如实施例中所述的)，已被正向选择的候选化合物可进行进一步的选择步骤。在一些实施方案中，考虑到进一步测定其在不同的体外或体内测定上的性能，已被正向选择的候选化合物可进行进一步的选择步骤。例如，测定所选化合物调节血糖、调节食物摄取、调节体重增加或减少、调节脂肪酸氧化、调节葡萄糖转运蛋白(例如GLUT-1或GLUT-4)的膜表达、调节PPARG的表达、调节葡萄糖摄取(例如摄取非放射性或放射性葡萄糖同位素)、调节糖酵解或调节脂肪生成的能力。典型地，此类测定在实施例中描述。

[0097] 生物标志物：

[0098] 本发明的另一个目的涉及一种测定受试者是否处于体重调节风险中的方法，包括：i)测定从所述受试者获得的血液样品中DBI的水平，ii)将在步骤i)中测定的水平与预定参考值相比较，和iii)当测定出在步骤i)中测定的水平与预定参考值之间存在差异时，得出所述受试者处于体重调节的风险中的结论。

[0099] 在一些实施方案中，当在步骤i)中测定的水平高于预定参考值时，本发明的方法特别适合于测定所述受试者是否处于体重增加的风险中。在一些实施方案中，当在步骤i)中测定的水平低于预定参考值时，本发明的方法特别适合于测定所述受试者是否处于体重减少的风险中。

[0100] 本发明的方法特别适合于测定受试者是否通过适合于调节体重增加或减少的饮

食或药物实现应答。在一些实施方案中，本发明的方法特别适合于测定复发的风险。

[0101] 如本文所用，术语“血液样品”是指衍生自患者的含有DBI的任何血液样品。在一些实施方案中，血液样品是易于含有DBI的血清或血浆样品。

[0102] 例如，通过任何用于测定样品中蛋白质水平的常规方法测定所述水平。在一些实施方案中，本发明的方法包括使血液样品与能够选择性地与易于存在于血液样品中的蛋白质相互作用的结合伴侣接触。结合伴侣可以是多克隆或单克隆抗体，优选单克隆抗体。在另一个实施方案中，结合伴侣可以是适配子。通过向选自例如猪、牛、马、兔、山羊、绵羊和小鼠等的宿主动物施用适当的抗原或表位，可以根据已知方法产生本发明的多克隆抗体或其片段。本领域已知的各种佐剂可用于增强抗体产生。尽管可用于实施本发明的抗体可以是多克隆的，但单克隆抗体是优选的。可以使用提供通过培养中的连续细胞系产生抗体分子的任何技术来制备和分离本发明的单克隆抗体或其片段。用于制备和分离的技术包括但不限于杂交瘤技术。在一些实施方案中，结合伴侣可以是适配子。适配子是一类在分子识别方面代表抗体的替代物的分子。适配子是寡核苷酸序列，其具有以高亲和力和特异性识别实际上任何类型的靶分子的能力。本发明的结合伴侣(诸如抗体或适配子)可以用可检测的分子或物质(诸如荧光分子、放射性分子或本领域已知的任何其他标记)标记。通常(直接或间接)提供信号的标签是本领域已知的。如本文所用，关于抗体的术语“标记”旨在涵盖通过偶联(即物理连接)可检测物质诸如放射性试剂或荧光团(例如荧光素异硫氰酸酯(FITC)或藻红蛋白(PE)或吲哚菁(Cy5))直接标记抗体或适配子，以及通过与可检测物质的反应性间接标记探针或抗体。可以通过本领域已知的任何方法用放射性分子标记本发明的抗体或适配子。前述测定通常涉及结合伴侣(即抗体或适配子)与固体支持物的结合。可用于实施本发明的固体支持物包括底物，诸如硝化纤维素(例如，以膜或微量滴定孔的形式)；聚氯乙烯(例如，薄片或微量滴定孔)；聚苯乙烯胶乳(例如珠或微量滴定板)；聚偏氟乙烯；重氮化纸；尼龙膜；活化珠；磁响应磁珠等。可以通过使用标准的免疫诊断技术来测量生物标志物蛋白的水平，包括免疫测定，诸如竞争、直接反应或夹心型测定。这些测定包括但不限于凝集测试；酶标记和介导的免疫测定，诸如ELISA；生物素/亲和素型测定；放射免疫测定；免疫电泳；免疫沉淀。更特别地，可以使用ELISA方法，其中例如微量滴定板的孔上包被一组识别所述生物标记物蛋白的抗体。然后，将含有或怀疑含有所述生物标记物蛋白的血液样品加入包被的孔中。在足以允许形成抗体-抗原复合物的孵育期后，可以洗涤板以去除未结合部分，并添加可检测地标记的次级结合分子。使次级结合分子与任何捕获的样品标记物蛋白反应，洗涤板，并使用本领域众所周知的方法检测次级结合分子的存在。在一些实施方案中，免疫测定可涉及使用对蛋白质具有特异性的2种抗体。典型地，第一抗体用于“检测”蛋白质和第二抗体用于“捕获”蛋白质。在一些实施方案中，通过以下方式实现所述方法：i)为固体支持物涂层提供一定量的对蛋白质具有特异性的第一抗体，ii)使样品与固体支持物接触，iii)并添加一定量的缀合至标签的第二抗体。测量对标签特异的结合的结合伴侣的量揭示了样品中存在的蛋白质的量。典型地，第一抗体针对不阻止与第二抗体相互作用的表位。典型地，在步骤ii)和iii)之后进行洗涤步骤(使用任何合适的缓冲液，诸如有或没有非离子型洗涤剂的PBS)。典型地，用含有BSA或奶和/或血清(山羊或牛)的缓冲液进行阻断步骤，以阻断蛋白质的非特异性结合。测量生物标记物蛋白的水平(采用或不采用基于免疫测定的方法)还可包括化合物的分离：基于化合物的分子量的离心；基于质量和电荷的电

泳;基于疏水性的HPLC;基于尺寸的尺寸排阻色谱法;基于化合物对所用特定固相的亲和力的固相亲和力。一旦分离,可以基于已知的“分离特征”(例如对于该化合物的保留时间)鉴定所述生物标志物蛋白,并使用标准技术测量。或者,可以通过例如质谱仪检测和测量目的蛋白质(例如,DBI)。

[0103] 在一些实施方案中,预定参考值是阈值或截止值。典型地,可以通过实验、经验或理论上测定“阈值”或“截止值”。如本领域普通技术人员将认识到的,阈值也可以基于现有的实验和/或临床条件而任意选择。例如,回顾性测量在适当存储的历史患者样本中DBI的表达水平可以用于建立预定参考值。在一些实施方案中,预定参考值得自来自一个或多个基本上健康的受试者(即,如上定义的正常BMI)的对照样品中的DBI水平。必须测定预定参考值,以便根据测试功能和益处/风险平衡(假阳性和假阴性的临床后果)获得优化的灵敏度和特异性。典型地,可以使用基于实验数据的接收器操作特征(ROC)曲线测定最佳灵敏度和特异性(以及阈值)。例如,在测定一组参考中的标记物水平后,可以使用算法分析对待测样品中标记物的测量水平进行统计处理,从而获得对样品分类具有重要意义的分类标准。ROC曲线的全称是接收器操作者特性曲线,也称为接收器操作特性曲线。它主要用于临床生化诊断测试。ROC曲线是反映真实阳性率(灵敏度)和假阳性率(1-特异性)的连续变量的综合指标。其通过图像合成方法揭示灵敏度和特异性之间的关系。将一系列不同的截止值(阈值或临界值,诊断测试的正常结果与异常结果之间的边界值)设置为连续变量,以计算出一系列敏感性和特异性值。然后,将灵敏度用作垂直坐标,将特异性用作水平坐标以绘制曲线。曲线下面积(AUC)越高,诊断的准确性越高。在ROC曲线上,最接近坐标图左上角的点是同时具有高灵敏度和高特异性值的临界点。ROC曲线的AUC值为1.0-0.5。当AUC>0.5时,随着AUC接近1,诊断结果会越来越好。当AUC为0.5-0.7时,准确性较低。当AUC为0.7-0.9时,准确性中等。当AUC高于0.9时,准确性非常高。该算法方法优选由计算机完成。可以使用现有技术中的现有软件或系统来绘制ROC曲线,诸如:MedCalc 9.2.0.1医疗统计软件、SPSS 9.0、ROCPOWER.SAS、DESIGNROC.FOR、MULTIREADER POWER.SAS、CREATE-ROC.SAS、GB STAT VI0.0(Dynamic Microsystems,Inc.Silver Spring,Md.,USA)等。

[0104] 通过以下附图和实施例将进一步说明本发明。但是,这些实施例和附图不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

附图说明

[0105] 图1.DBI的作用和DBI对人和小鼠自噬的抑制作用。(A-D)。细胞外DBI对培养细胞自噬的影响。在最后的2h内,在不存在或存在BAFA1的情况下,在中和DBI抗体(其任选热灭活)的存在下,将H4-GFP-LC3细胞培养6h(A)。或者,在类似条件下培养WT H4细胞,然后检测自噬相关的LC3-II(B)。在存在或不存在BAFA1的情况下将H4-GFP-LC3细胞(C)或WT H4细胞(D)与重组(rec.)DBI蛋白一起培养,并测量自噬。与同种型或未处理对照组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001(Student t-检验)。(E、F)。细胞外DBI对小鼠自噬的影响。小鼠腹膜内注射中和DBI特异性抗体(E)或静脉内注射recDBI(F)。处理4h后,用亮抑酶肽处理小鼠,并在2小时后恢复肝脏,并通过免疫印迹监测自噬相关参数(LC3-II增加,SQSTM1减少)(每组n=3只小鼠)。

[0106] 图2.厌食症或肥胖症患者的血浆DBI浓度。与年龄和性别相匹配的正常体重对照

者(A,B)相比,测量神经性厌食症(A)、肥胖症(B)或减肥手术之前或之后一年的肥胖症(C)患者队列中的血浆DBI。结果是平均值±SEM。***P<0.001(Student t-检验)。结果是每组5只小鼠的平均值。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。完整数据如表S1所示。

[0107] 图3.DBI的糖酵解作用和致食性作用。(A-C)。DBI编码载体的流体动力注射。小鼠(每组n=5)接受仅载体的i.v.注射或表达小鼠Dbi cDNA的构建体的i.v.注射,并随时间监测血糖(A)、食物摄入(B)或体重增加(C)。结果是平均值±SEM。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,用于与仅载体对照进行比较。(D-H)。重组(rec.)DBI蛋白对全身代谢的影响。将小鼠(每组n=5)静脉内注射仅介质或rec DBI或DBI衍生肽TTN或ODN和血糖(D),同时在指定的时间点测量食物摄入(E,F)和体重增加(G)。或者,如箭头所示施用rec.DBI蛋白,并通过呼吸测定法在24小时内测量脂肪酸氧化(H)。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,用于与介质对照进行比较。

[0108] 图4.用特异性抗体中和细胞外DBI的厌食作用。(A-D)。DBI中和对葡萄糖以及进食行为的影响。i.p.注射单克隆抗DBI(抗DBI mAb7A)(A)或多克隆抗DBI(抗DBI,ab16871)(C)和同型对照抗体后30分钟,在喂食或不喂食(24小时)小鼠(每组n=5)中测量血浆葡萄糖水平。随时间监测重新喂食后的食物摄入(B,D)。结果表示为平均值±SEM(n=5)。*P<0.05,***P<0.001,表示与同种型对照相比的抗DBI作用,并且$P<0.05,$$$P<0.001,表示与未喂食对照小鼠相比,在未喂食小鼠中的抗DBI作用。

[0109] 图5.DBI中和诱导肝脏脂肪生成的全面抑制。通过免疫印迹测量DBI中和对各种肝蛋白表达的作用,每条泳道代表一只小鼠(A)。定量结果(B)是与接受同种型的喂食小鼠相比的平均值±SEM(n=5)*p<0.05。

[0110] 图6.抗DBI的自身免疫的厌食作用。将小鼠单独注射匙孔血蓝蛋白(KLH)或与rec.DBI蛋白结合的KLH(KLH-DBI)。将产生抗DBI的IgG自身抗体的小鼠与仅KLH免疫的对照比较,以监测饥饿条件下的体重减轻(每组5只动物)(A)、饥饿24h后的食物摄入(B),并测量正常(C)或高脂饮食(D)的小鼠(每组7-8只)的累积体重增加。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001用于DBI特异性自身抗体的作用。

具体实施方式

[0111] 材料和方法

[0112] 化学品、细胞系和培养条件。除非另有说明,否则用于细胞培养的培养基和补充剂购自Gibco-Invitrogen(Carlsbad,CA,USA),塑料制品购自Corning B.V.Life Sciences(Schiphol-Rijk,The Netherlands)且化学品购自Sigma-Aldrich(St Louis,MO,USA)。将所有细胞系均在37℃、在5%CO_2的条件下,在含有10%胎牛血清、100mg/L丙酮酸钠、10mM HEPES缓冲液、100单位/mL青霉素G钠和100μg/mL硫酸链霉素的培养基中培养。此外,细胞类型特异性培养条件包括用于人宫颈癌HeLa细胞和人脑神经胶质瘤H4细胞及其表达GFP-LC3的衍生物的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)。如上补充的最低必需培养基Eagle(EMEM)加上2mM谷氨酰胺和1%非必需氨基酸(NEAA)用于人肝细胞癌Hep G2细胞。将细胞分别接种在6孔、94孔板中,并在处理前生长24h,单独和/或与50nM巴菲霉素A1(BafA1,Tocris)、100nM雷帕霉素(Rapa)、针对DBI的抗体(antiDBI)、重组蛋白DBI(recDBI)组合生长指定的时间。为了剥夺血清和营养物质(NF),将细胞在不含血清的Hank平衡盐溶液(HBSS)中培养。

[0113] 人细胞培养物中的质粒转染和RNA干扰。从OriGene(Rockville,MD,USA)获得编码DBI cDNA的质粒。用AttracteneR试剂(Qiagen,Hilden,Germany)进行瞬时质粒转染,并且除非另有说明,转染后24h分析细胞。在6孔或96孔板中培养细胞,并以50%汇合转染。在存在对DBI和TSPO特异性的100nM siRNA(Qiagen)的情况下,借助RNAi MaxTM转染试剂(Invitrogen,Eugene,USA)反向转染siRNA,将杂乱的siRNA用作对照。通过免疫印迹控制siRNA介导的蛋白下调。

[0114] 免疫荧光。将细胞在室温下用4%PFA固定15分钟,并用0.1%Triton X-100透化10分钟。用PBS中的5%牛血清阻断非特异性结合位点,然后在4℃下用一抗染色过夜。将细胞染色以检测DBI(Santa Cruz)。用适当的AlexaFluor™偶联物(Molecular Probes-Invitrogen)开发一抗。将细胞核用Hoechst 33342(10μg/ml)标记。分别在配备DC300F相机和LSM 510显微镜(Carl Zeiss,Jena,Germany)或莱卡SPE共聚焦显微镜的IRE2显微镜(Leica Microsystems)上进行标准和共聚焦荧光显微镜评估(40x)。至于点平均面积的定量,使用40X物镜用共聚焦显微镜捕获图像。将获取的图像转换为8位二进制文件,并通过ImageJ软件(NIH)计算每个图像上面积大于四个像素的单个GFP-LC3色斑的面积。每个实验至少进行3次,每种条件下定量40-50个细胞。

[0115] 自动化显微镜。在刺激前24h,将稳定表达GFP-LC3的H4、Hep G2或HeLa细胞接种在96孔成像板(BD Falcon,Sparks,USA)中。用指定试剂处理细胞4-6h。随后,将细胞用4%PFA固定并用10μM Hoechst 33342复染。使用配备与自动Twister II平板处理机(Caliper Life Sciences,Hopkinton,USA)连接的40X物镜(Olympus,Center Valley,USA)的BD pathway 855自动显微镜(BD Imaging Systems,San José,USA)获取图像。通过BD Attovision软件(BD Imaging Systems)分析图像以确定细胞质中GFP-LC3色斑的存在。根据制造商的标准程序,将细胞表面分割并分为细胞质和核区。使用RB 2x2和Marr-Hildreth算法识别细胞质GFP-GALT、GFP-LC3、RFP-FYVE、GFP-GALT-RFP-LC3、GFP-RFP-LC3阳性点。统计分析在R软件(http://www.r-project.org/)上进行。

[0116] 免疫印迹。为了进行免疫印迹,在4-12%Bis-Tris丙烯酰胺(Invitrogen)或12%Tris-甘氨酸SDS-PAGE预制凝胶(Biorad,Hercules,USA)上分离25μg蛋白质,然后电转移至Immobilon™膜(Millipore Corporation,Billerica,USA)。然后,根据目标蛋白的分子量将膜切成不同的部分,以允许在同一实验中同时检测不同的抗原。通过将膜在补充有5%脱脂奶粉(在TBS中为w:v)的0.05%Tween 20(在TBS中为v:v)中孵育1h,然后将其与对DBI(XXX)、SQSTM1/p62(Santa Cruz Biotechnology,CA,USA)、LC3、FASN、p-p70s6k、p70s6k、p-SREBP、SREBP、GLUT1、GLUT4、TSPO、PPARG(Cell Signalling,Danvers,MA,USA)特异性的一抗孵育过夜。使用适当的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(Southern Biotech,Birmingham,USA)加上SuperSignal West Pico化学发光底物(Thermo Scientific-Pierce)进行显影。抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体(GAPDH;Chemicon International,Temecula,USA)或抗肌动蛋白(Abcam,Cambridge,MA,USA)用于控制泳道的相等负荷。

[0117] 小鼠实验和组织处理。喂食野生型(WT)(Charles River Laboratory,Lentilly,France)、GFP-LC3-转基因(N.Mizushima教授的礼物),$Beclin^{+/-}$C57BL/6(B.Levine博士的礼物)、$Ambra^{gt/gt}$(P.Boya博士的礼物)、$Atg4b^{-/-}$(C.Lopez-Otin博士的礼物)的C57BL/6小鼠并根据FELASA和动物实验伦理委员会指南(CE n.26:2012-65,2012-67;Val de Marne,

France)维持。将小鼠饲养在温度控制的具有12h明/暗循环的环境中,并任意接受食物和水或高脂饮食(HFD)。使小鼠饥饿24-48h,或腹膜内或静脉内注射DBI、DBI衍生的肽或DBI特异性抗体,并在1h至6h后处死。提取后立即将组织在液氮中冷冻,并使用Precellys 24组织匀浆器(Bertin Technologies,Montigny-le-Bretonneux,France)在20mM Tris缓冲液(pH 7.4)中以5500rpm的速度均化两个循环20s,所述缓冲液含有150mM NaCl、1%Triton X-100、10mM EDTA和Complete®蛋白酶抑制剂混合物(Roche Applied Science)。然后,将组织提取物在4℃下以12,000g离心,并收集上清液。通过二喹啉甲酸技术(BCA蛋白质测定试剂盒,Pierce Biotechnology,Rockford,IL)评估上清液中的蛋白质浓度。

[0118] DBI检测:体内处理后,通过以15000rpm的速度离心30分钟收集血液收集管的血浆,并按照制造商的指示使用DBI ELISA(Mybiosource MBS2025156)测定血浆中的DBI量。对于体外实验,在刺激前24h将H4、Hep G2或HeLa细胞接种于96孔成像板(BD Falcon,Sparks,USA)。用指示剂处理细胞指定的时间并收集上清液,使用DBI ELISA(Abnova KA0532 DBI(Human)ELISA)测定上清液中的DBI量。

[0119] 免疫。用100μl平衡盐溶液中的100μg明矾沉淀的KLH(Calbiochem,La Jolla,CA)在尾巴底部皮下免疫获自Harlan France(Gannat,France)的6-8周龄C57BL/6雄性小鼠。通过将DBI与匙孔血蓝蛋白(KLH)交联制备DBI-KLH。表达DBI自身抗体的转基因小鼠通过肌内注射接受Montanide ISA51vg佐剂中乳化的生理盐水KLH-DBI(30g、30g、30g、10g,每周一次,持续4周)。为了产生KLH-DBI偶联物,将鼠DBI以1:20的摩尔比混合并逐渐调节至0.25%最终(v/v)戊二醛。通过添加甘氨酸溶液终止反应。超滤(Millipore;Billerica,Massachusetts,USA)后,添加甲醛溶液至最终浓度为0.2%(v/v)。通过添加甘氨酸溶液淬灭反应,然后使用具有70mM磷酸盐缓冲液(pH 7.8)的100kDa膜进行超滤。将DBI-KLH储存在4℃。以相同方式制备用作对照抗原的IFNgf,除了在不存在KLH的情况下进行交联反应并且最终膜的分子量截留值为10kDa。通过Bradford测定法测定蛋白质浓度。

[0120] 线虫菌株:我们遵循标准程序来维持秀丽隐杆线虫(C.elegans)菌株。对于我们所有的实验,饲养温度都设置为20℃。我们使用DA2123:WT;Is[p_{lgg-1}GFP::LGG-1+rol-6(su1006)],MAH14:daf-2(e1370);[p_{lgg-1}GFP::LGG-1+rol-6(su1006)]和MAH28:aak-2(ok524);[p_{lgg-1}GFP::LGG-1+rol-6(su1006)]用于评估自噬(40,41)。第一个菌株与SV62:acbp-1(sv62)I和四重FE0017:acbp-1(sv62)I;acbp-6(tm2995)II;acbp-4(tm2896)III;acbp-3(sv73)X strains(42)杂交以在acbp家族基因耗尽后监测自噬。为了进行咽泵测量,将SV62和FE0017菌株与DA465:eat-2(ad465)II(一种减少咽泵的遗传模型)联合使用。

[0121] 秀丽隐杆线虫的自噬测量:按照(43)所述方法测量自噬。简言之,允许十只具有各自遗传背景的良好饲养的成年蠕虫在NGM或RNAi板上产卵。四小时后,去除亲本并将板置于20℃。两天后,收集同步动物,用10mM左旋咪唑麻醉并固定在载玻片上进行显微镜检查。在L3-L4幼虫阶段的皮下接缝细胞中测量GFP::LGG-1阳性自噬色斑的数量(44)。按(45)所述方法测量咽泵。在立体显微镜下测量自由移动动物的磨床运动。对每个个体进行三次独立的测量,并记录每只动物的平均泵数。通过将动物置于无细菌的NGM平板中24小时来实现饥饿。在观察之前,将动物置于接种有OP50的板上恢复半小时。

[0122] 小鼠脑的免疫组化。将小鼠用戊巴比妥(Nembutal,Abbott Laboratories,Chicago,IL;80mg/kg ip)深度麻醉,并用磷酸盐缓冲液(PB;0.1M)、然后是4%多聚甲醛(于

0.1M PB中)心内灌注。取出脑,在相同的固定剂中固定2h,在20%蔗糖溶液(于0.1M PB中)中冷冻保护48h,然后在CO_2中速冻。在低温恒温器(CM 3050Leica,Nussloch,Germany)中切下冠状切片(20μm)。将下丘脑切片以三个单独的系列收集,并解冻安装在显微镜载玻片上(SuperFrost Plus,Faust,Schaffhausen,Switzerland)。在室温下风干并在PBS中再水化后,将切片在阻断溶液中孵育2h(1.5%兔正常血清+抗生物素蛋白;Vector Laboratories,Burlingame,CA)。将一抗(多克隆山羊抗c-Fos,Santa Cruz;1:10,000+biotin,Vector Laboratories)在4℃施用48h。通过在PBS中洗涤去除未结合的抗体,然后将切片与二抗(生物素化的兔抗山羊,Vectastain-Elite ABC Kit,Vector Laboratories;1:200)在室温下一起孵育2h。在ABC溶液(Vectastain-Elite ABC Kit,Vector Laboratories)中孵育后,将二氨基苯并二烯(DAB)用作发色体[在含有0.02%H_2O_2的PBS中为0.04%,并且用于颜色增强0.08%$NiCl_2$(×$6H_2O$),0.01%$CoCl_2$(×$6H_2O$)]。最后,将切片在分级的酒精中脱水,在二甲苯中清除,并用Entellan(Merck,Darmstadt,Germany)进行盖玻片培养。

[0123] 酵母自噬的测量:通过使用荧光显微镜检查表达EGFP-Atg8融合蛋白的细胞对Atg8p的液泡定位或根据公开的方法使用BY4741野生型或dbi1转化细胞通过碱性磷酸酶(ALP)活性来监测自噬。

[0124] 结果和讨论

[0125] 自噬(“自食”)构成细胞生物学中最引人注目的(尽管被精细地调节)的现象之一,并且通过促进细胞质结构的更新并允许细胞适应不断变化且有压力的条件(包括营养缺乏),在维持细胞和生物体内稳态中起关键作用(1、2)。几种无前导蛋白的细胞分泌(其只能通过绕过高尔基体的非常规途径释放)与自噬密切相关(3-7)。此蛋白的一种是被称为地西泮结合蛋白(DBI)或酰基辅酶A(CoA)结合蛋白(ACBP)的系统发育古老因子(3,4)。人或小鼠DBI是87个氨基酸(10kDa)的小蛋白,具有两种完全不同的功能,即作为细胞内的ACBP(其中其结合长链酰基CoA分子)和作为细胞外的DBI(其中完整的蛋白质或其裂解产物,triacontatetraneuropeptide[TTN,残基17-50]和十八神经肽[ODN,残基33-50],可以与A型γ-氨基丁酸受体($GABA_AR$)的苯并二氮卓结合位点相互作用并调节其作为GTP蛋白偶联受体(GPCR)的活性)(8-10)。DBI及其蛋白水解片段还结合外周型苯并二氮卓受体(PBR)(11-13)以及未鉴定的GPCR(ODN-GPCR)(14-17)。在这里,我们解决了有关DBI分泌是否可能参与自噬反馈调节的问题。

[0126] 自噬刺激条件下,无营养(NF)培养的或经雷帕霉素(RAPA)处理的人细胞系表明细胞内DBI表达降低,这可通过添加溶酶体抑制剂(如巴氟霉素A1(BAFA1)、氯喹和羟氯喹)以及通过缺失必需的自噬基因/蛋白质ATG5(数据未显示)来抑制。在基线条件下,可在培养物上清液中检测到可溶性DBI,但在NF培养物中可溶性DBI增加,除非添加BAFA1或去除ATG5(数据未显示)。类似地,遭受饥饿24h的自噬感受态野生型(WT)小鼠(而非自噬缺陷的$Becn1^{+/-}$)的若干器官中DBI的细胞内含量下降(数据未显示),已知饥饿24h的条件诱导机体的大多数细胞中的自噬(18)。同时,来自WT(但非来自部分自噬缺陷的$Becn1^{+/-}$、$Atg4b^{-/-}$和$Ambra1^{gt/gt}$小鼠)的血浆饥饿后的DBI水平升高(数据未显示)。这些结果证实体内自噬诱导引起细胞内DBI释放到细胞外区室中。

[0127] 小干扰RNA(siRNA)耗尽DBI会减少培养的人细胞中NF刺激的自噬(数据未显示),而其过表达会刺激自噬通量(数据未显示)。当通过跟踪与绿色荧光蛋白(GFP)偶联的微管

相关蛋白1A/1B轻链3B(LC3)重新分布到自噬体以及通过测量LC3脂化作用(导致其电泳迁移率增加)来监测自噬时,可获得此结果(数据未显示)。同时,如MTOR底物$p70^{S6K}$磷酸化增加所表明,DBI沉默增加雷帕霉素(MTOR)的机械靶标(自噬的负调节剂)的激酶活性(数据未显示)。因此,可通过与晚期内体/溶酶体适配子、MAPK和MTOR激活剂5(LAMTOR5)的直接分子相互作用(19)而与MTOR途径相交的细胞内DBI负向调节mTOR并且正向调节自噬。来自细胞的自噬依赖的DBI耗尽可激活自分泌反馈回路,从而导致自噬过程的自我限制。

[0128] 敲除酵母(酿酒酵母)acb1基因(其编码DBI直系同源物)抑制NF诱导的自噬(数据未显示),而仅敲除线虫(秀丽隐杆线虫)acbp-1基因,或敲除线虫(秀丽隐杆线虫)acbp-1基因以及若干个同源物(其存在于该物种中,但不存在于哺乳动物中),刺激自噬(数据未显示)。这种差异表明,这种系统发育的古老蛋白在单细胞和多细胞环境中可能具有不同的自噬调节功能。实际上,当DBI在大多数培养的与少数仍表达DBI的细胞混合的人细胞中缺失siRNA时(其抑制这些细胞中的自噬,数据未显示),这种操作增强了后者的自噬(数据未显示)。类似地,在培养基中添加中和细胞外DBI的抗体刺激自噬通量(图1.A,B),而添加重组(rec)DBI蛋白(或其TTN和ODN片段的蛋白)在培养的人类细胞中抑制NF诱导的自噬(图1C-D)。类似地,通过向小鼠腹膜内(i.p.)注射特异性抗体来中和细胞外DBI诱导各种器官的自噬(图1E),而系统性静脉内(i.v.)或i.p.施用rec.DBI蛋白抑制饥饿诱导的自噬(图1F)。这些结果表明细胞外DBI抑制自噬(与细胞内DBI刺激自噬这一事实相反),这意味着自噬诱导的DBI从细胞释放可能参与旁分泌反馈回路。

[0129] 在52例神经性厌食症患者队列中,血浆DBI浓度与正常体重指数(BMI)的年龄和性别相匹配的对照相比异常偏低(图2A),证实了之前关于24例厌食症患者的报告(20)。更重要的是,肥胖个体的DBI浓度异常高(在减肥手术后降低),这与高循环胰岛素水平相关(图2B,C)。类似地,遗传肥胖的Ob/Ob小鼠(其具有瘦素受体缺陷)表现出增强的循环DBI水平(数据未显示)。基于这些发现,我们调查了DBI是否可能调节一般代谢。为此,将rec.DBI蛋白和抗DBI抗体分别注射到喂食和饥饿的小鼠中,两个小时后对其器官进行质谱代谢组学分析。Rec.DBI蛋白引起低血糖。相反,DBI中和逆转由饥饿诱导的低血糖,并进一步加剧了由饥饿诱导的酮体2-羟基丁酸血浆水平的增加(数据未显示)。因而,我们决定研究葡萄糖和脂肪酸代谢中DBI对体重控制的影响。

[0130] 流体动力注射编码DBI的cDNA,该过程增加DBI的肝脏表达,导致低血糖、增加食物摄入并引起体重增加(图3A-C)。类似地,系统(i.p.或i.v.)注射rec.DBI蛋白(或其肽片段TTN或ODN的蛋白)刺激低血糖三联症、食物摄入和体重增加(图3D-G)。同时,如通过呼吸测定法测定,rec.DBI蛋白在全身水平上减少了脂肪酸氧化(图1H)。rec.DBI蛋白具有致食性作用的发现与之前显示将DBI片段施用于大脑具有厌食性的报道(21,22)相反。因此,通过i.p.或i.v.途径注射的rec.DBI蛋白可能通过外周而不是中枢神经起作用的。事实上,系统施用rec.DBI快速(30分钟)引起葡萄糖转运蛋白(GLUT1)和过氧化物酶体增殖物激活的受体gamma-γ(PPARG)的肝脏上调,其通过脂肪酸合酶(FASN)上调脂肪生成(数据未显示)。因此,rec.DBI增强^{14}C原子从葡萄糖到内脏脂肪的掺入(数据未显示)。此外,当添加到人HepG2肝细胞中时,rec.DBI刺激基本和最大的糖酵解(数据未显示)。i.p.注射葡萄糖逆转DBI诱导的低血糖可预防摄食过量(数据未显示)。因此,DBI驱动葡萄糖摄取、糖酵解和脂肪生成,最终引起低血糖,触发进食反应。

[0131] 鉴于rec.DBI蛋白的致食作用,我们研究了耗尽或中和内源性DBI是否会引起厌食。携带组成型Dbi基因敲除(Dbi$^{-/-}$)的小鼠死亡(23)或受多种缺陷的影响,包括其表皮屏障功能(24-33),显然不能用于区分DBI的细胞内和细胞外功能。我们生成了可以通过他莫昔芬注射(使用他莫昔芬(Tam)诱导的Cre重组酶介导的floxed Dbi的切除)有条件地敲除Dbi的小鼠(数据未显示)。Tam诱导的全身敲除DBI杀死了一部分饲喂正常食物的成年C57Bl/6小鼠(数据未显示),未能损害高脂饮食(HFD)小鼠的存活(数据未显示),但使小鼠对饥饿引起的死亡敏感(数据未显示)。尽管葡萄糖水平维持在正常血糖范围内(数据未显示),但DBI缺陷的小鼠因饥饿引起的体重减轻增加(数据未显示)。为了仅中和细胞外DBI,我们制备了单克隆抗体(mAb 7A,IgG)。系统(i.p.)注射不同的抗DBI抗体增加喂食和饥饿小鼠的血浆葡萄糖水平(图4A,C),并减少饥饿后的食物摄入(图4B,D)。用若干种中和DBI的商业多克隆抗体获得了非常相似的结果(数据未显示)。与全身DBI基因敲除相反,即使在饥饿的小鼠中,mAb 7A和多克隆抗体也不会导致死亡。在基线(数据未显示)和饥饿状态(数据未显示)中,DBI的阻滞抑制了全身脂肪酸的氧化。尽管由DBI中和诱导高血糖,饥饿小鼠仍表现出血浆胰岛素水平、C肽和胃抑制肽(GIP)的降低(数据未显示)。

[0132] 在肝脏中,中和DBI降低了PPARG和FASN的表达,因为它引起了固醇调节元件结合转录因子1(SREBF1)的抑制性磷酸化,对应于抑制脂肪生成(图5)。因此,在致肥胖的高脂饮食的背景下,中和DBI可以减少脂肪肝。

[0133] 接下来,我们研究了通过用具有与匙孔血蓝蛋白(KLH)偶联的DBI以及强效佐剂的免疫小鼠来打破对DBI的自我耐受性并诱导中和性自身抗体产生的可能性(34)。循环中持久中和DBI的自身抗体激增(数据未显示)对代谢有重大影响,尽管没有致死作用(如对于全身敲除所记录的),导致饥饿期间体重减轻增加(图6A)和饥饿后重新喂食减少(图6B)。此外,针对DBI进行自身免疫后,通常在饲喂正常食物或HFD的小鼠中发现的体重增加减少了(图6C,D)。在饲喂HFD的小鼠中,针对DBI的免疫下调肝脏脂肪生成刺激因子(FASN)、增加肝肉碱棕榈酰转移酶-1(CPT1,其是脂肪酸摄取所必需的)、增加肝脏中肉碱脂肪酸酰、抑制脂肪肝、降低多种游离脂肪酸的高脂血症并且上调棕色脂肪中解偶联蛋白1(UCP1),因为它减少了白色脂肪组织的数量(数据未显示)。

[0134] 来自饥饿小鼠和进行DBI中和的小鼠的不同组织的代谢组学比较揭示,棕色脂肪组织(BAT)(数据未显示)和血浆(数据未显示)的相似性强于肝脏和肌肉(未显示)。尽管DBI中和作用对代谢的影响必须归因于外周作用(中枢神经系统之外),但抗体介导的DBI阻滞抑制了食源性下丘脑外侧区域(LH)的神经元和厌食性腹膜内侧核(VMN)中的活化神经元,如通过评估转录因子c-Fos的磷酸化来测定(数据未显示)。总之,这些结果表明,针对DBI的被动免疫和主动免疫两者均发挥有效的抗肥胖作用。

[0135] 我们的数据指向其中饥饿诱导的自噬经历三个水平的DBI介导的反馈调节的模型。自噬导致DBI分泌,从细胞中耗尽该促自噬因子(自分泌调节),然后在细胞外空间积累的DBI作用于其他细胞以抑制自噬(旁分泌调节)。此外,循环DBI刺激进食行为,因此增加了养分吸收并去除了自噬诱导(内分泌调节)的主要原因。后一种作用在系统发育上似乎是保守的,因为经历了一种或几种DBI直系同源物耗尽的秀丽隐杆线虫显示出咽泵的减少(数据未显示)。因此,DBI可能参与原始反射,其中营养消耗通过诱导自噬而刺激进食行为。

[0136] 除了具有自噬抑制作用外,细胞外DBI还具有对全身代谢的有效调节作用。在患有

神经性厌食症的青少年中，循环DBI水平较低。这与在小鼠中观察到的短期饥饿诱导的DBI水平增加形成对照。这种差异的原因仍然难以捉摸。但是，很容易推测与厌食症相关的DBI水平降低(可能是由于长期重新调整了测定转录水平DBI表达的设定值所致)(35)可能与表型有关，因为编码DBI的基因的缺失或中和DBI蛋白对小鼠具有厌食作用，减少饥饿后的食物摄入。与之形成鲜明对比的是，通过系统注射重组蛋白(或其活性肽片段)来提供细胞外DBI通过有利于低血糖而刺激食物摄取，继而上调摄入肝细胞的葡萄糖，并增加糖酵解以及脂肪生成。实际上，病态肥胖的患者或小鼠表现出血浆DBI水平升高。DBI表达增加的原因仍然不清楚。肥胖与自噬抑制有关(36、37)，意味着改变的自噬通量可能无法解释循环性DBI的增加。相反，肥胖相关的DBI升高可促进自噬抑制，进而抵消体重减轻并倾向于增加体重(38,39)。此外，细胞外DBI水平升高有利于致食和成脂反应，如所观察到的，DBI的缺失或中和可抑制食欲，减少体重增加，并钝化HFD诱导的肥胖和脂肪肝。DBI的中和可通过注射单克隆或多克隆抗体以及诱导自身抗体来实现。如果长期的DBI阻滞免于有害的副作用并且构成了期望的治疗目标，则后一种策略可能对于预防或治疗病态肥胖特别有用。

[0137] 参考文献

[0138] 贯穿本申请，各种参考文献描述了本发明所属的本领域技术水平。这些参考文献的公开内容通过引用并入本文。

[0139] 1.B.Levine,N.Mizushima,H.W.Virgin,Autophagy in immunity and inflammation.Nature 469,323-335(2011).

[0140] 2.N.Mizushima,B.Levine,A.M.Cuervo,D.J.Klionsky,Autophagy fights disease through cellular self-digestion.Nature 451,1069-1075(2008).

[0141] 3.J.M.Duran,C.Anjard,C.Stefan,W.F.Loomis,V.Malhotra,Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes.J Cell Biol 188,527-536(2010).

[0142] 4.R.Manjithaya,C.Anjard,W.F.Loomis,S.Subramani,Unconventional secretion of Pichia pastoris Acb1 is dependent on GRASP protein,peroxisomal functions,and autophagosome formation.J Cell Biol 188,537-546(2010).

[0143] 5.N.Dupont et al.,Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta.EMBO J 30,4701-4711(2011).

[0144] 6.M.Zhang,R.Schekman,Cell biology.Unconventional secretion,unconventional solutions.Science 340,559-561(2013).

[0145] 7.M.Ponpuak et al.,Secretory autophagy.Curr Opin Cell Biol 35,106-116(2015).

[0146] 8.J.Bormann,Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor(DBI)on GABAA receptors.Neuropharmacology 30,1387-1389(1991).

[0147] 9.P.W.Gray,D.Glaister,P.H.Seeburg,A.Guidotti,E.Costa,Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor,a natural ligand of an allosteric regulatory site of the gamma-aminobutyric acid type A receptor.Proc Natl Acad Sci U S A 83,7547-7551(1986).

[0148] 10.C.A.Christian et al.,Endogenous positive allosteric modulation of

GABA(A)receptors by diazepam binding inhibitor.Neuron 78,1063-1074(2013).

[0149] 11.A.Berkovich,P.McPhie,M.Campagnone,A.Guidotti,P.Hensley,A natural processing product of rat diazepam binding inhibitor, triakontatetraneuropeptide(diazepam binding inhibitor 17-50)contains an alpha-helix,which allows discrimination between benzodiazepine binding site subtypes.Mol Pharmacol 37,164-172(1990).

[0150] 12.V.Papadopoulos,A.Berkovich,K.E.Krueger,E.Costa,A.Guidotti,Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors.Endocrinology 129,1481-1488(1991).

[0151] 13.P.Gandolfo et al.,The triakontatetraneuropeptide TTN increases[CA2+]i in rat astrocytes through activation of peripheral-type benzodiazepine receptors.Glia 35,90-100(2001).

[0152] 14.C.Patte et al.,The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes.FEBS Lett 362,106-110(1995).

[0153] 15.P.Gandolfo et al.,The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide(ODN)on cytosolic Ca2+in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors.Eur J Pharmacol 322,275-281(1997).

[0154] 16.J.Leprince et al.,Synthesis,conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN.Design of a potent endozepine antagonist.Eur J Biochem 268,6045-6057(2001).

[0155] 17.Z.Farzampour,R.J.Reimer,J.Huguenard,Endozepines.Adv Pharmacol 72,147-164(2015).

[0156] 18.N.Mizushima,A.Yamamoto,M.Matsui,T.Yoshimori,Y.Ohsumi,In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker.Mol Biol Cell 15,1101-1111(2004).

[0157] 19.W.Fan,J.Cheng,S.Zhang,X.Liu,Cloning and functions of the HBxAg-binding protein XBP1.Mol Med Rep 7,618-622(2013).

[0158] 20.E.Conti et al.,Reduced fasting plasma levels of diazepam-binding inhibitor in adolescents with anorexia nervosa.Int J Eat Disord 46,626-629(2013).

[0159] 21.D.Lanfray et al.,Gliotransmission and brain glucose sensing:critical role of endozepines.Diabetes 62,801-810(2013).

[0160] 22.F.Guillebaud et al.,Glial Endozepines Inhibit Feeding-Related Autonomic Functions by Acting at the Brainstem Level.Front Neurosci 11,308(2017).

[0161] 23.D.Landrock et al.,Acyl-CoA binding protein gene ablation induces pre-implantation embryonic lethality in mice.Lipids 45,567-580(2010).

[0162] 24.D.Neess et al.,Disruption of the acyl-CoA-binding protein gene delays hepatic adaptation to metabolic changes at weaning.J Biol Chem 286,3460-3472(2011).

[0163] 25.S.Langaa et al.,Mice with targeted disruption of the acyl-CoA binding protein display attenuated urine concentrating ability and diminished renal aquaporin-3 abundance.Am J Physiol Renal Physiol 302,F1034-1044(2012).

[0164] 26.M.Bloksgaard et al.,The acyl-CoA binding protein is required for normal epidermal barrier function in mice.J Lipid Res 53,2162-2174(2012).

[0165] 27.D.Neess et al.,Delayed hepatic adaptation to weaning in ACBP-/-mice is caused by disruption of the epidermal barrier.Cell Rep5,1403-1412(2013).

[0166] 28.M.Bloksgaard,D.Neess,N.J.Faergeman,S.Mandrup,Acyl-CoA binding protein and epidermal barrier function.Biochim Biophys Acta 1841,369-376(2014).

[0167] 29.S.Bek et al.,Compromised epidermal barrier stimulates Harderian gland activity and hypertrophy in ACBP-/-mice.J Lipid Res 56,1738-1746(2015).

[0168] 30.D.Neess,S.Bek,H.Engelsby,S.F.Gallego,N.J.Faergeman,Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling:Role of acyl-CoA binding proteins.Prog Lipid Res 59,1-25(2015).

[0169] 31.K.Bouyakdan et al.,A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes.J Neurochem 133,253-265(2015).

[0170] 32.L.Budry et al.,DBI/ACBP loss-of-function does not affect anxiety-like behaviour but reduces anxiolytic responses to diazepam in mice.Behav Brain Res 313,201-207(2016).

[0171] 33.S.F.Gallego et al.,Quantitative lipidomics reveals age-dependent perturbations of whole-body lipid metabolism in ACBP deficient mice.Biochim Biophys Acta 1862,145-155(2017).

[0172] 34.L.Semerano et al.,Targeting VEGF-A with a vaccine decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis.Angiogenesis 19,39-52(2016).

[0173] 35.D.Neess et al.,ACBP--a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene.Mol Cell Biochem 284,149-157(2006).

[0174] 36.L.Yang,P.Li,S.Fu,E.S.Calay,G.S.Hotamisligil,Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance.Cell Metab 11,467-478(2010).

[0175] 37.K.H.Kim,M.S.Lee,Autophagy--a key player in cellular and body metabolism.Nat Rev Endocrinol 10,322-337(2014).

[0176] 38.G.Marino et al.,Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-

coenzyme A.Mol Cell 53,710-725(2014).

[0177] 39.A.F.Fernandez et al.,Autophagy couteracts weight gain,lipotoxicity and pancreatic beta-cell death upon hypercaloric pro-diabetic regimens.Cell Death Dis 8,e2970(2017).

[0178] 40.D.F.Egan et al.,Phosphorylation of ULK1(hATG1)by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy.Science 331,456(2011).

[0179] 41.C.Kang,Y.-j.You,L.Avery,Dual roles of autophagy in the survival of Caenorhabditis elegans during starvation.Genes&Development 21,2161-2171(2007).

[0180] 42.Ida C.Elle et al.,Tissue-and paralogue-specific functions of acyl-CoA-binding proteins in lipid metabolism in<em>Caenorhabditis elegans</em&gt.Biochemical Journal 437,231(2011).

[0181] 43.N.J.Palmisano,A.Meléndez,Detection of Autophagy in Caenorhabditis elegans Using GFP::LGG-1 as an Autophagy Marker.Cold Spring Harbor protocols 2016,pdb.prot086496(2016).

[0182] 44.A.Meléndez et al.,Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life-Span Extension in<em>C.elegans</em&gt.Science 301,1387(2003).

[0183] 45.J.Keane,L.Avery,Mechanosensory inputs influence Caenorhabditis elegans pharyngeal activity via ivermectin sensitivity genes.Genetics 164,153-162(2003).

序列表

<110> 国家医疗保健研究所

<120> 用于调节自噬的方法和药物组合物

<130> BIO17506 KROEMER/MC

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 87
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Ser Gln Ala Glu Phe Glu Lys Ala Ala Glu Glu Val Arg His Leu
1 5 10 15

[0001]

Lys Thr Lys Pro Ser Asp Glu Glu Met Leu Phe Ile Tyr Gly His Tyr
20 25 30

Lys Gln Ala Thr Val Gly Asp Ile Asn Thr Glu Arg Pro Gly Met Leu
35 40 45

Asp Phe Thr Gly Lys Ala Lys Trp Asp Ala Trp Asn Glu Leu Lys Gly
50 55 60

Thr Ser Lys Glu Asp Ala Met Lys Ala Tyr Ile Asn Lys Val Glu Glu
65 70 75 80

Leu Lys Lys Lys Tyr Gly Ile
85

<210> 2

<211> 634
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2

[0002]

gctcgcccga gcagggttgg ggcgagtgga ccgcgcctct aaaggcgctt gccagtgcaa 60

tctgggcgat cgcttcctgg tcctcgcctc ctccgctgtc tccctggagt tcttgcaagt 120

cggccaggat gtctcaggct gagtttgaga aagctgcaga ggaggttagg caccttaaga 180

ccaagccatc ggatgaggag atgctgttca tctatggcca ctacaaacaa gcaactgtgg 240

gcgacataaa tacagaacgg cccgggatgt tggacttcac gggcaaggcc aagtgggatg 300

cctggaatga gctgaaaggg acttccaagg aagatgccat gaaagcttac atcaacaaag 360

tagaagagct aaagaaaaaa tacgggatat gagagactgg atttggttac tgtgccatgt 420

gtttatccta aactgagaca atgccttgtt tttttctaat accgtggatg gtgggaattc 480

gggaaaataa ccagttaaac cagctactca aggctgctca ccatacggct ctaacagatt 540

aggggctaaa acgattactg actttccttg agtagttttt atctgaaatc aattaaaagt 600

gtatttgtta ctttaaataa ctttaaaaaa aaaa 634

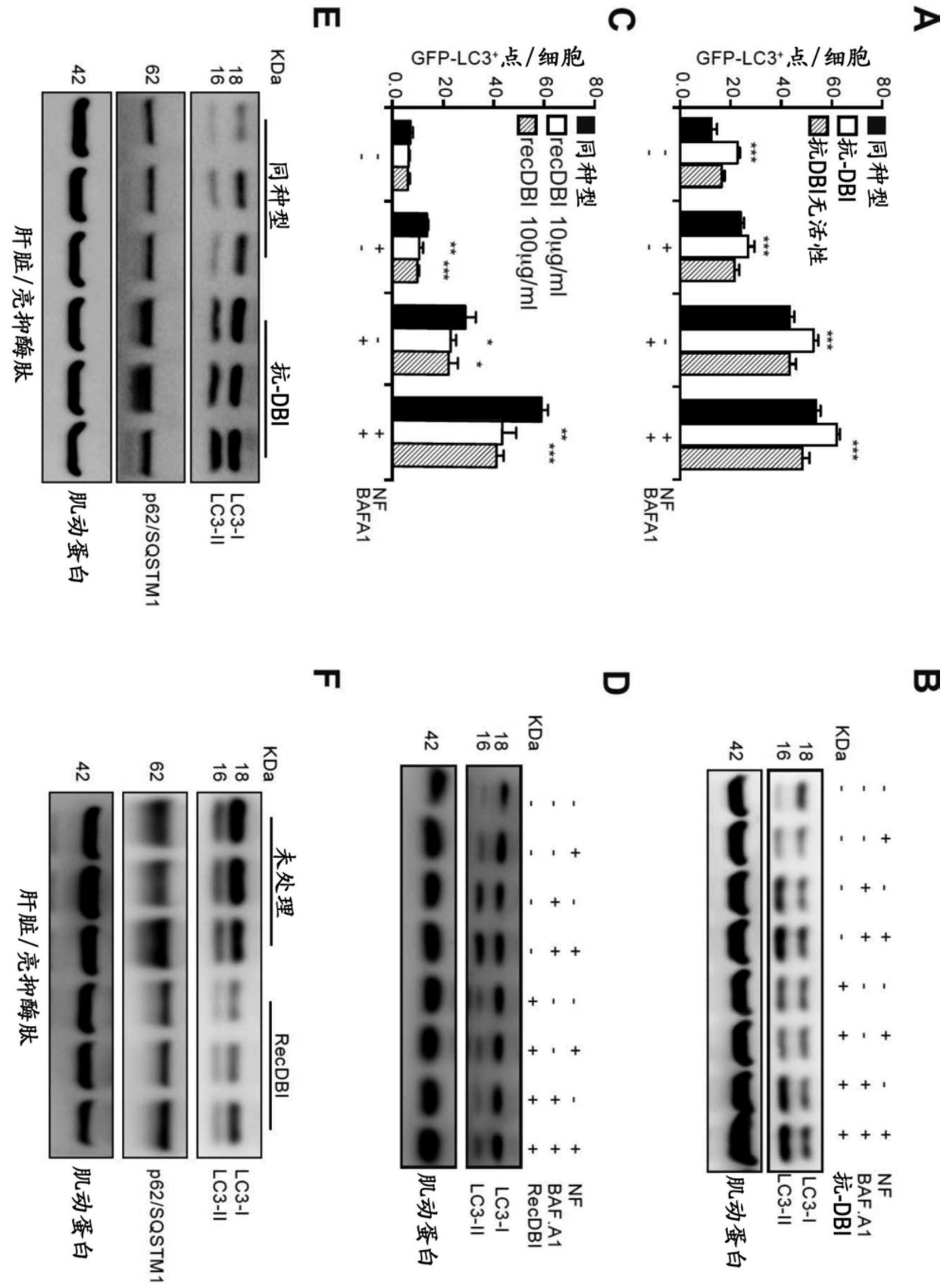

A
GFP-LC3+点/细胞
同种型
抗-DBI
抗DBI无活性
NF
BAFA1
B
KDa
NF
BAF.A1
抗-DBI
LC3-I
LC3-II
肌动蛋白
C
GFP-LC3+点/细胞
同种型
recDBI 10μg/ml
recDBI 100μg/ml
NF
BAFA1
D
KDa
NF
BAF.A1
RecDBI
LC3-I
LC3-II
肌动蛋白
E
KDa
同种型
抗-DBI
LC3-I
LC3-II
p62/SQSTM1
肌动蛋白
肝脏/壳抑酶肽
F
KDa
未处理
RecDBI
LC3-I
LC3-II
p62/SQSTM1
肌动蛋白
肝脏/壳抑酶肽

图1

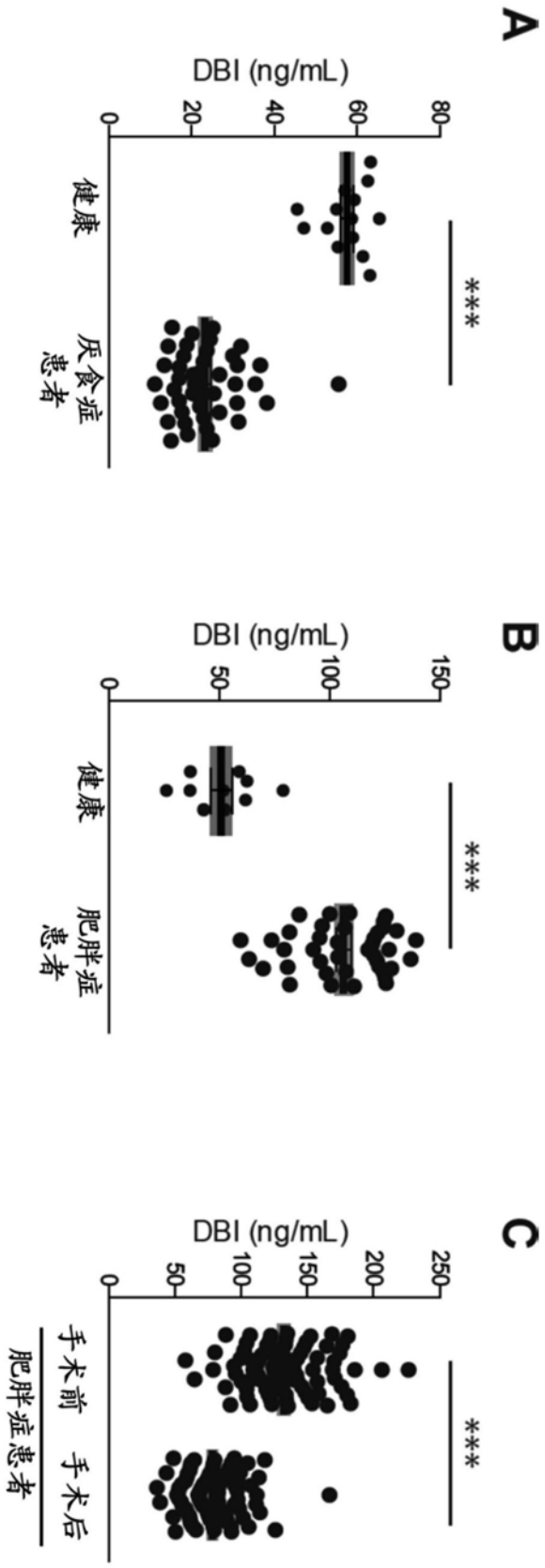

A
DBI (ng/mL)
0
20
40
60
80
健康
厌食症患者
***
B
DBI (ng/mL)
0
50
100
150
健康
肥胖症患者
***
C
DBI (ng/mL)
0
50
100
150
200
250
手术前
手术后
肥胖症患者
***

图2A-C

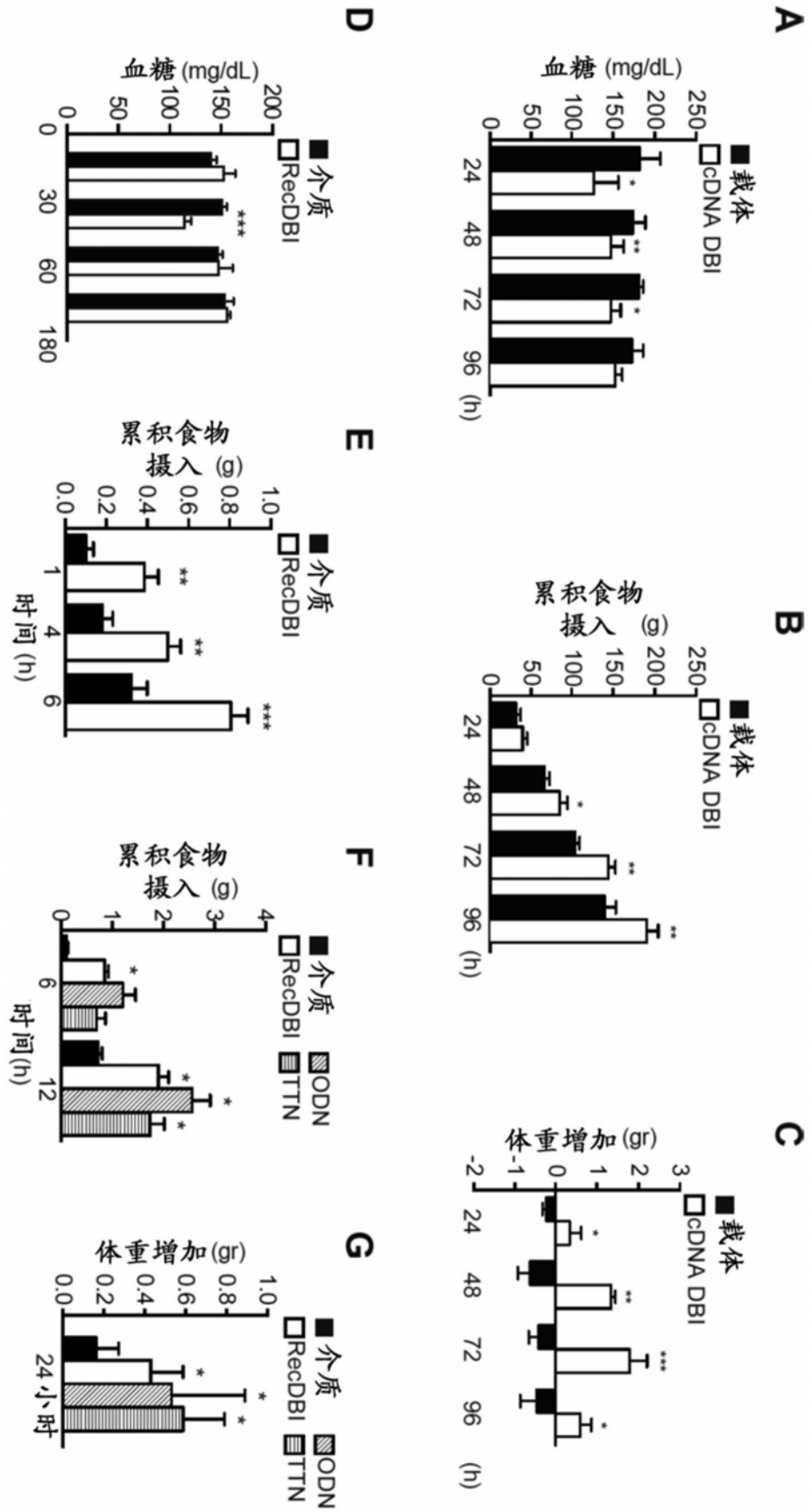

A
血糖 (mg/dL)
0
50
100
150
200
250
■载体
□cDNA DBI
24
48
72
96
(h)
B
累积食物
摄入 (g)
C
体重增加 (gr)
D
血糖 (mg/dL)
■介质
□RecDBI
0
30
60
180
E
累积食物
摄入 (g)
时间 (h)
F
累积食物
摄入 (g)
ODN
TTN
G
体重增加 (gr)
24 小时

图3A-G

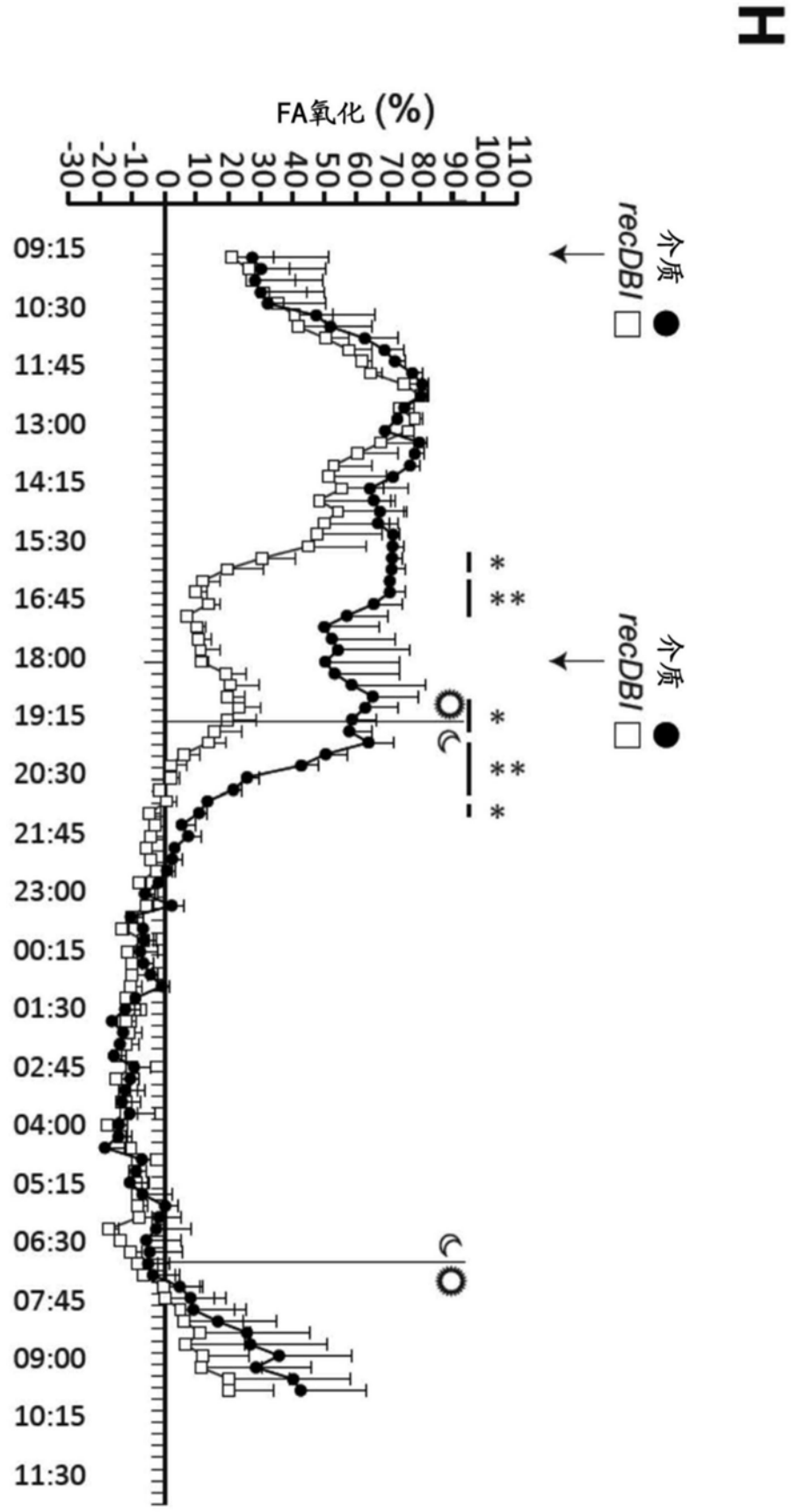

H
FA氧化 (%)
-30
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
09:15
10:30
11:45
13:00
14:15
15:30
16:45
18:00
19:15
20:30
21:45
23:00
00:15
01:30
02:45
04:00
05:15
06:30
07:45
09:00
10:15
11:30
介质
recDBI
介质
recDBI
*
**
*
**
*

图3H

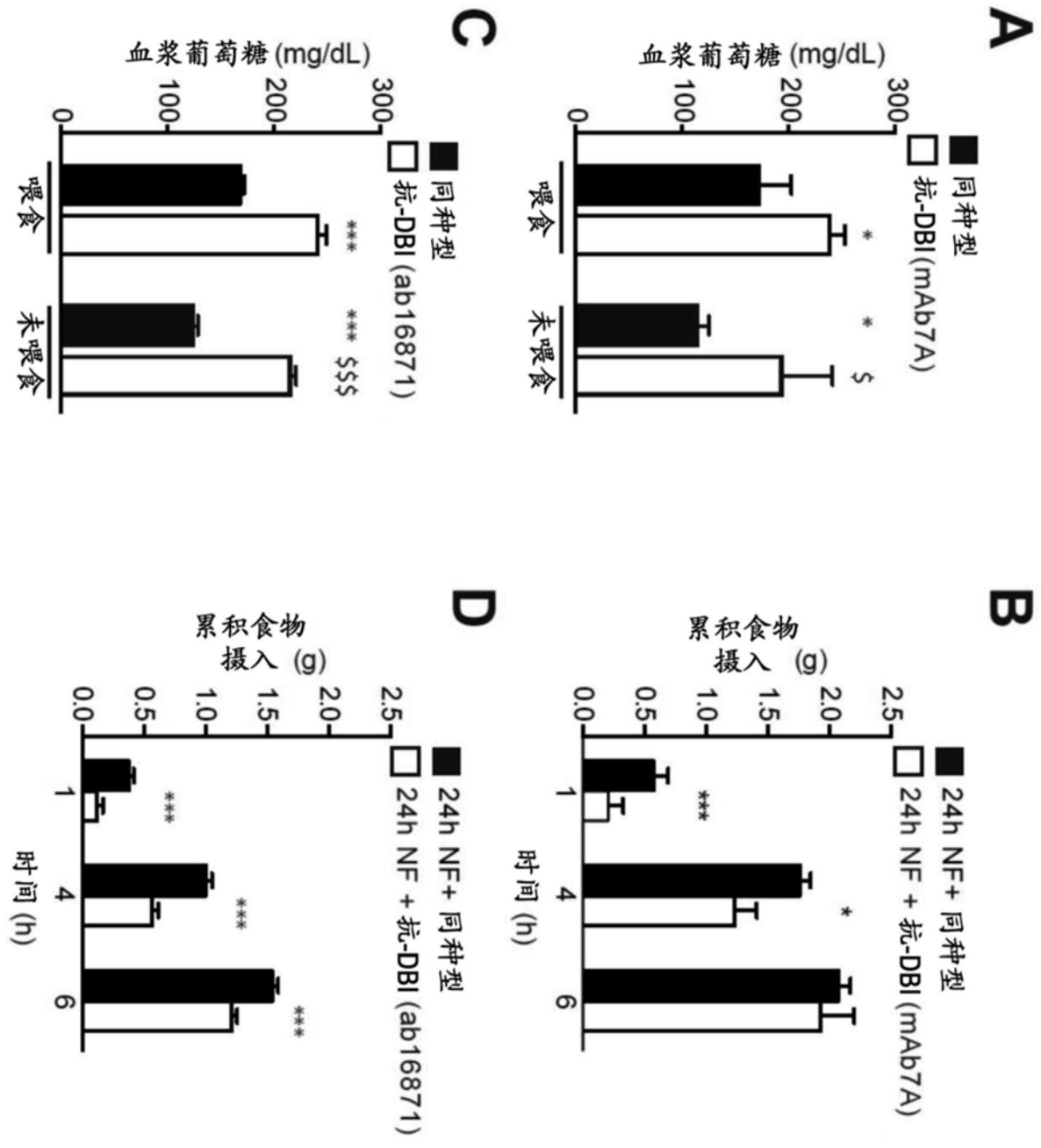

A
血浆葡萄糖 (mg/dL)
0
100
200
300
同种型
抗-DBI(mAb7A)
喂食
未喂食
*
*
$
C
血浆葡萄糖 (mg/dL)
同种型
抗-DBI (ab16871)
***
***
$$$
B
累积食物摄入 (g)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
24h NF+ 同种型
24h NF + 抗-DBI (mAb7A)
***
*
时间 (h)
1
4
6
D
累积食物摄入 (g)
24h NF+ 同种型
24h NF + 抗-DBI (ab16871)
***
***
***
时间 (h)

图4

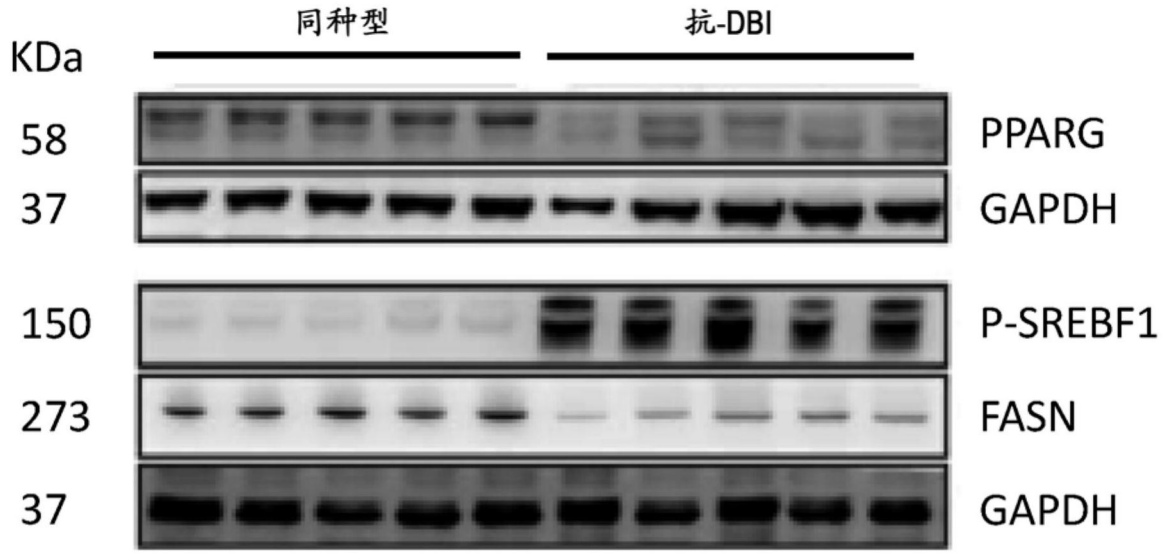

同种型
抗-DBI
KDa
58
37
150
273
37
PPARG
GAPDH
P-SREBF1
FASN
GAPDH

图5A

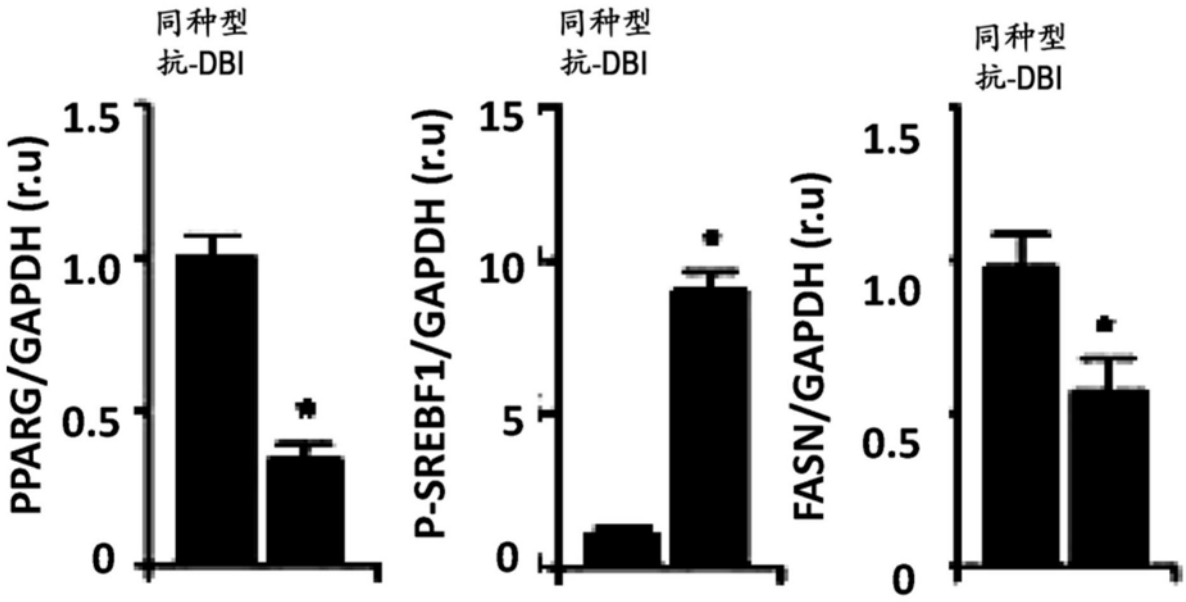

同种型
抗-DBI
PPARG/GAPDH (r.u)
1.5
1.0
0.5
0
同种型
抗-DBI
P-SREBF1/GAPDH (r.u)
15
10
5
0
同种型
抗-DBI
FASN/GAPDH (r.u)
1.5
1.0
0.5
0

图5B

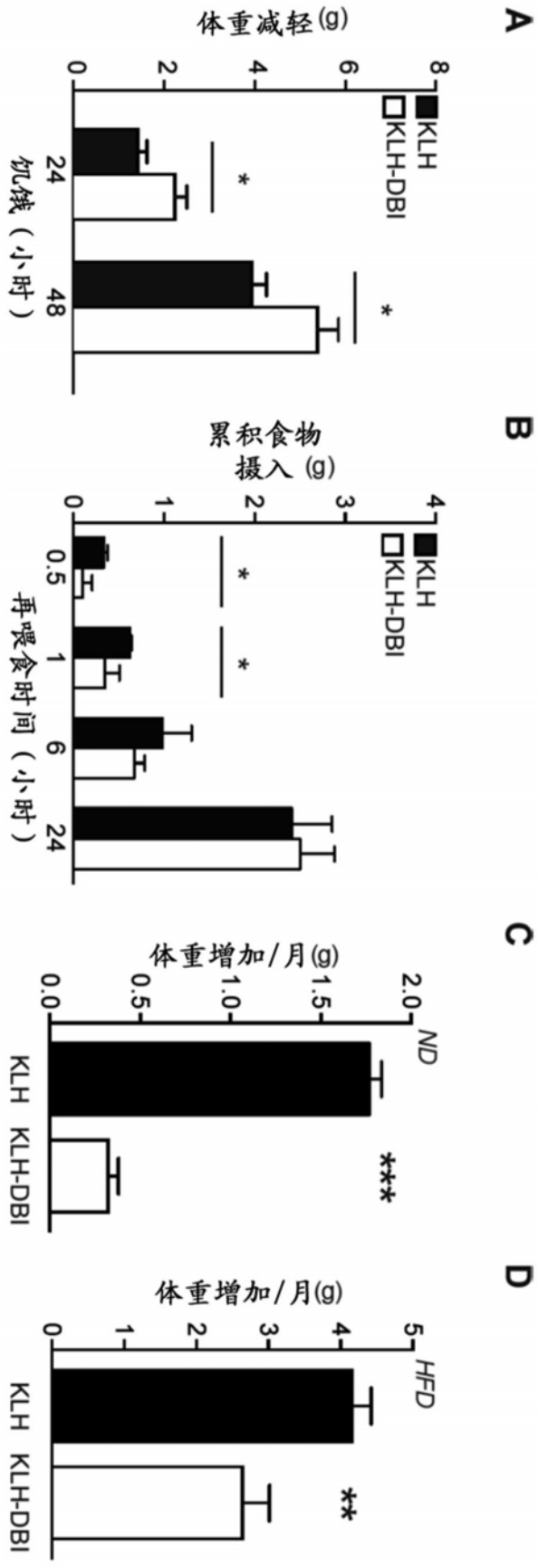

A
体重减轻(g)
0
2
4
6
8
KLH
KLH-DBI
24
48
饥饿（小时）
*
*
B
累积食物
摄入 (g)
0
1
2
3
4
KLH
KLH-DBI
0.5
1
6
24
再喂食时间（小时）
*
*
C
体重增加/月(g)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
ND
KLH
KLH-DBI
***
D
体重增加/月(g)
0
1
2
3
4
5
HFD
KLH
KLH-DBI
**

图6