

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **028218**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.10.31

(21) Номер заявки
201391063

(22) Дата подачи заявки
2012.01.19

(51) Int. Cl. **A61K 38/17** (2006.01)
C07K 14/775 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) АПОЛИПОПРОТЕИН А-IV В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА

(31) 61/434,196

(32) 2011.01.19

(33) US

(43) 2013.12.30

(86) PCT/US2012/021802

(87) WO 2012/100010 2012.07.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЦИНЦИННАТИ
(US)

(72) Изобретатель:
Тсо Патрик, Дэвидсон Шон, Вудс
Стивен, Ван Фэй (US)

(74) Представитель:
Лыу Т.Н. (RU)

(56) DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; July 2002 (2002-07), OKUMURA TOSHIKATSU ET AL.: "Physiology of the small intestine in the glycemic control and the treatment of diabetes mellitus", XP002676412, Database accession no. PREV200200415101, abstract & OKUMURA TOSHIKATSU ET AL.: "Physiology of the small intestine in the glycemic control and the treatment of diabetes mellitus", FOLIA PHARMACOLOGICA JAPONICA, vol. 120, no. 1, July 2002 (2002-07), pages 29-31, ISSN: 0015-5691 WO-A2-2009116861 WO-A1-9315198

(57) В изобретении описаны способы лечения сахарного диабета II типа у субъекта, нуждающегося в этом, и фармацевтические композиции для лечения сахарного диабета второго типа. Способы включают введение эффективного количества апополипротеина А-IV субъекту. Фармацевтическая композиция содержит апополипротеин А-IV, полученный для введения субъекту для лечения сахарного диабета II типа. Также описаны способы для существенного восстановления толерантности к глюкозе у субъекта, нуждающегося в этом, до нормального уровня и способы снижения уровней глюкозы в крови у субъекта, нуждающегося в этом.

B1**028218****028218****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу лечения диабета. Более подробно, настоящее изобретение относится к способу лечения сахарного диабета второго типа путем введения эффективного количества аполипопротеина A-IV.

Уровень техники

Возникновение диабета является широко распространенным, приблизительно 8% населения в Соединенных Штатах страдают от диабета. Диабет представляет собой хроническое заболевание, характеризующееся высоким сахаром в крови вследствие неспособности организма эффективно производить и/или использовать инсулин. Диабет может привести к различным физическим осложнениям, включая, но не ограничиваясь ими, почечную недостаточность, слепоту, повреждение нерва, заболевание сердца, апноэ во время сна и глютеинозную болезнь. Например, в Соединенных Штатах диабет является основной причиной почечной недостаточности, слепоты, ампутации, паралича и сердечного приступа. Также в Соединенных Штатах диабет является шестой основной причиной смертельных случаев и, было показано, снижает продолжительность жизни взрослых людей среднего возраста от пяти до десяти лет.

Наиболее распространенной формой диабета является сахарный диабет второго типа (в дальнейшем "T2DM"), T2DM характеризуется гипергликемией, инсулиновой резистентностью, дисфункцией β -клеток и дисрегуляцией печеночного глюконеогенеза. Люди, страдающие от T2DM, испытывают снижение секреции инсулина, стимулированной глюкозой, связанной с уменьшением высвобождения гранул, запасенных инсулином, из β -клеток в первой фазе секреции инсулина. Во второй фазе секреции инсулина люди, страдающие от T2DM, испытывают постепенное снижение способности активно синтезировать инсулин в ответ на воздействие глюкозы. Распространенность T2DM возрастает и в 2002 T2DM привела к расходам более \$130 млрд в медицинском обслуживании. В связи с этим, необходимы новые терапии для эффективного лечения T2DM.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что аполипопротеин A-IV является эффективным противодиабетическим пептидом, который непосредственно вовлечен в регрессию T2DM. Аполипопротеин A-IV является ключевым гормоном желудочно-кишечного тракта, который способствует толерантности к глюкозе после еды и действует как ранее недооцененный медиатор в улучшении толерантности к глюкозе.

Соответственно в одном варианте осуществления раскрыт способ лечения сахарного диабета II типа (T2DM) у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

X₁EVSAQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX₂LKA
KIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVHEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKX₃LSLPELEQQQEQX₄QEQQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4),

где X₁ представляет собой G, A, V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

В другом варианте осуществления раскрыт способ снижения уровня глюкозы в крови у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

X₁EVSAQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX₂LKA
KIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVHEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKX₃LSLPELEQQQEQX₄QEQQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4),

где X₁ представляет собой G, A, V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

В еще одном варианте осуществления раскрыт способ восстановления толерантности к глюкозе у субъекта до нормального уровня, включающий введение субъекту эффективного количества аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

X₁EVSDQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX₂LKA
KIDQNVEELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHL SFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKX₃LSLPELEQQQEQQX₄QEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4)

где X₁ представляет собой G, A, V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

В конкретном варианте осуществления изобретения в указанных способах субъектом является человек. В другом конкретном варианте осуществления в указанных способах аминокислотная последовательность аполипопротеина A-IV представляет собой

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKA
KIDQNVEELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHL SFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 3).

При этом аполипопротеин A-IV может быть гликозилированным или негликозилированным. Еще в одном другом конкретном варианте осуществления изобретения аполипопротеин A-IV вводят системно. Системное введение аполипопротеина A-IV может быть выбрано из группы, состоящей из перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и внутрибрюшинного введения. В одном конкретном варианте осуществления аполипопротеин A-IV вводят в дозе от 1 до 10 мкг/г. В другом конкретном варианте осуществления аполипопротеин A-IV вводят в дозе от 0.25 до 2 мкг/г. В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения аполипопротеин A-IV вводят в дозе 1 мкг/г. Аполипопротеин A-IV могут вводить один раз в день или 2 раза в день.

В одном аспекте настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для лечения сахарного диабета II типа, содержащей эффективное количество аполипопротеина A-IV, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, где аминокислотная последовательность аполипопротеина A-IV представляет собой

X₁EVSDQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX₂LKA
KIDQNVEELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHL SFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKX₃LSLPELEQQQEQQX₄QEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4),

где X₁ представляет собой G, A, V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

В одном варианте осуществления этого аспекта изобретения композиция представляет собой жидкую композицию, например водную композицию. В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения фармацевтическая композиция свободна от пирогенов.

В указанной фармацевтической композиции аминокислотная последовательность аполипопротеина A-IV может представлять собой

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLREI Q
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKA
KIDQNVEELKGR LTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHL SFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 3).

При этом аполипопротеин A-IV может быть гликозилированным или негликозилированным.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения сахарного диабета II типа у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества вышеописанной фармацевтической композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к противодиабетическому полипептиду аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKEELRRLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKA
KIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVHEELRRSLAPYAQDTQEKLNNHGLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLNGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKTSLPELEQQEQEQEQEQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 3).

При этом указанный полипептид может быть гликозилированным или негликозилированным. Эти и другие отличительные признаки и преимущества данного и других различных вариантов осуществления согласно настоящему изобретению станут очевидными в свете чертежей, подробного описания и формулы изобретения, приведенных в настоящей заявке.

Краткое описание чертежей

Следующее подробное описание вариантов осуществления настоящего изобретения может быть более понятным при прочтении совместно со следующими чертежами, где подобную структуру указывают аналогичными номерами ссылок, и на которых:

на фиг. 1 представлен вид с боку устройства, имеющего резервуар с фармацевтической композицией и шприц согласно осуществлению настоящего изобретения;

на фиг. 2 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) у самцов аполипопротеин A-IV нокаутных мышей и мышей дикого типа относительно времени (мин) в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 3 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) относительно времени (мин) в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе в аполипопротеин A-IV диком типе и нокаутных животных в возрасте 16 месяцев;

на фиг. 4 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) относительно времени (мин) у самцов аполипопротеин A-IV нокаутных мышей после интраперитонеального введения рекомбинантного аполипопротеина A-IV (мкг/г) или физиологического раствора в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 5 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) относительно времени (мин) у аполипопротеин A-IV нокаутных мышей после интраперитонеального введения рекомбинантного аполипопротеина A-IV (мкг/г) или физиологического раствора в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 6 представлен график секреции инсулина (нг/мл) относительно времени (мин) у аполипопротеин A-IV нокаутных мышей после интраперитонеального введения рекомбинантного аполипопротеина A-IV (мкг/г) или физиологического раствора;

на фиг. 7 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/мл) относительно времени (мин) у аполипопротеин A-IV нокаутных мышях и мышях дикого типа на постоянном рационе с высоким содержанием жира в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 8 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/мл) относительно времени (мин) у аполипопротеин A-IV нокаутных мышей на постоянном рационе с высоким содержанием жира после интраперитонеального введения рекомбинантного мышиног аполипопротеина A-IV (1 мкг/г) или физиологического раствора в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 9 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) относительно времени (ч) у страдающих диабетом мышей после интраперитонеального введения рекомбинантного мышиног аполипопротеина A-IV (1 мкг/г) или физиологического раствора в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 10 изображены результаты вестерн-блоттинга уровня сывороточного амилоидного А белкового компонента у аполипопротеин A-IV нокаутных мышей, мышей дикого типа и аполипопротеин A-I нокаутных мышей;

на фиг. 11 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) у самок аполипопротеин A-IV нокаутных мышей и мышей дикого типа относительно времени (мин) в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе (IPGTT);

на фиг. 12 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) относительно времени (мин) у мышей дикого типа после интраперитонеального введения 1.0 мкг/г человеческого аполипопротеина A-IV или физиологического раствора в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 13 представлен график глюкозы плазмы крови (мг/дл) относительно времени (мин) у самок

мышей дикого типа после интраперитонеального введения 1.0 мкг/г рекомбинантного мышиногo аполипопротеина A-IV или физиологического раствора в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 14 представлена гистограмма, показывающая влияние 10 мкг/г человеческого апоA-IV на человеческие островки, разрушенные 30 мМ KCl и 250 мкМ диазоксидом в присутствии 3 или 20 мМ глюкозы;

на фиг. 15 представлен белок с полноразмерной аминокислотной последовательностью дикого типа человеческого аполипопротеина A-IV (SEQ ID NO. 1);

на фиг. 16 представлен белок с полноразмерной аминокислотной последовательностью дикого типа мышиногo аполипопротеина A-IV (SEQ ID NO. 2);

на фиг. 17 представлен белок с полноразмерной аминокислотной последовательностью дикого типа человеческого аполипопротеина A-IV с добавлением глицина на N-конец (SEQ ID NO. 3);

на фиг. 18 представлен белок с аминокислотной последовательностью человеческого аполипопротеина A-IV, показывающий полиморфные замены T347S, Q360H и/или E165K и необязательные добавления глицина, аланина или валина к N-концу (SEQ ID NO. 4);

на фиг. 19 представлен полинуклеотид (SEQ ID NO. 5), кодирующий полноразмерный дикого типа человеческий аполипопротеин A-IV.

Специалисту в данной области техники понятно, что элементы на чертежах иллюстрированы для простоты и ясности и не обязательно выполнены в полном масштабе. Например, размеры некоторых элементов на чертежах могут быть преувеличены относительно других элементов, а также обычные части удалены, чтобы помочь улучшить понимание различных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Следующие термины применяются в настоящей заявке.

В данном контексте термин "эффективное количество" описывает количество, необходимое или достаточное для получения желаемого биологического эффекта. Эффективное количество для любого конкретного применения может изменяться в зависимости от различных факторов, включающих, но не ограничиваясь ими, конкретную композицию, которую вводят, размеры субъекта и/или степень тяжести заболевания и/или состояние, подвергающееся лечению. В одном варианте осуществления, "эффективное количество" представляет собой дозу приблизительно от 0.25 до 10 мкг/г аполипопротеина A-IV или его биологически активного аналога. Кроме того, "эффективным количеством" апоA-IV или его биологически активного аналога является приблизительно от 1 до 10 мкг/г, приблизительно от 0.25 до 2 мкг/г или приблизительно 1 мкг/г. апоA-IV или биологически активный аналог вводят один раз в день. Кроме того, апоA-IV или его биологически активный аналог вводят приблизительно 2 раза в день. В еще одном альтернативном варианте, апоA-IV или его биологически активный аналог вводят более чем два раза в день, например три раза в день. В еще одном альтернативном варианте, апоA-IV вводят один раз в два, три, четыре, пять или шесть дней или один раз в неделю.

В данном контексте термин "желательный биологический эффект" описывает уменьшение эффектов, нейтрализация и/или устранение заболевания или состояния. Например, в контексте T2DM, желательные биологические эффекты включают, но не ограничиваются ими, снижение глюкозы в крови, улучшение толерантности к глюкозе, значительное восстановление толерантности к глюкозе до нормального уровня, улучшение секретности инсулина и/или значительное восстановление секреции инсулина до нормального уровня.

В данном контексте термин "нормальный уровень" описывает уровень, который, по существу, такой же, как уровень у субъекта, который не нуждается в лечении. Например, в контексте лечения T2DM, нормальный уровень глюкозы в крови составляет приблизительно от 70 до приблизительно 130 мг/дл до еды и по меньшей мере приблизительно от 180 мг/дл от 1 до 2 ч после приема пищи или от приблизительно 70 до приблизительно 100 мг/дл до еды и по меньшей мере приблизительно 140 мг/дл от 1 до 2 ч после приема пищи. В другом примере в контексте лечения T2DM, нормальный уровень толерантности к глюкозе описывает способность субъекта к метаболизму углеводов, при котором уровень глюкозы в крови составляет приблизительно от 70 до приблизительно 130 мг/дл до еды и по меньшей мере приблизительно 180 от 1 до 2 ч после приема пищи или от приблизительно 70 до приблизительно 100 мг/дл до еды и по меньшей мере приблизительно 140 мг/дл от 1 до 2 ч после приема пищи. В еще одном примере в контексте лечения T2DM нормальным уровнем секреции инсулина является количество, необходимое для поддержания нормального уровня толерантности к глюкозе, где уровень секреции инсулина составляет более чем приблизительно 1 нг/мл около 15 ч после еды.

В контексте уровня глюкозы в крови термин "восстановление" описывает изменение уровня глюкозы в крови у субъекта до нормального уровня. Подобным образом, в контексте толерантности к глюкозе, термин "восстановление" описывает изменение толерантности к глюкозе у субъекта до нормального уровня. Также, в контексте секреции инсулина, "восстановление" описывает изменение секреции инсулина у субъекта до нормального уровня.

В контексте аполипопротеина A-IV термин "биологически активный фрагмент" описывает фрагмент аполипопротеина A-IV, который способен осуществить желательный биологический эффект у субъекта с T2DM. Термин "биологически активный аналог" описывает аналог аполипопротеина A-IV, который способен осуществить желательный биологический эффект у субъекта с T2DM. В одном примере, желательный биологический эффект представляет собой восстановление толерантности к глюкозе у апо-A-IV нокаутных мышей, как описано в примере 2. Другой пример желательного биологического эффекта является причиной статистически значимого снижения аномальных уровней глюкозы у животной модели T2DM, такой как мышьяная модель, описанная в примере 7.

В данном контексте термин "ожирение" описывает состояние, при котором субъект значительно больше нормального веса. В одном конкретном примере, термин ожирение описывает состояние, при котором субъект более чем приблизительно 20% больше своего идеального веса и/или имеет индекс массы тела приблизительно тридцать или более чем приблизительно тридцать. В одном варианте осуществления субъект, который подвергается лечению, страдал ожирением; в другом варианте осуществления субъект, который подвергается лечению, не страдал ожирением и в еще одном варианте осуществления субъект, который подвергается лечению, имел нормальную массу тела. Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам лечения T2DM у субъекта, нуждающегося в этом, и фармацевтической композиции для лечения T2DM. В одном варианте осуществления, раскрыт способ лечения диабета. В одном конкретном варианте осуществления раскрыт способ лечения T2DM у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение эффективного количества аполипопротеина A-IV (далее "апоA-IV") или его биологически активного аналога субъекту.

В одном варианте осуществления способ лечения T2DM является эффективным для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта. В одном конкретном варианте осуществления способ является эффективным для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта от приблизительно 20 до 50%. В дополнительном варианте осуществления способ является эффективным для снижения уровня глюкозы в крови у субъекта от приблизительно 40%. В еще одном варианте осуществления способ является эффективным для значительного восстановления уровня глюкозы в крови до нормального уровня.

В другом варианте осуществления способ лечения T2DM является эффективным для значительного восстановления толерантности к глюкозе у субъекта до нормального уровня. В одном конкретном варианте осуществления способ является эффективным для значительного восстановления толерантности к глюкозе у субъекта до нормального уровня в течение приблизительно 2 ч после введения дозы апоA-IV или его биологически активного аналога. В другом варианте осуществления толерантность к глюкозе у субъекта значительно восстанавливается до нормального уровня в течение приблизительно 8 до 12 ч.

В еще одном варианте осуществления лечение является эффективным для восстановления секреции инсулина до нормального уровня. В одном конкретном варианте осуществления лечение является эффективным для значительного восстановления секреции инсулина до нормального уровня в течение приблизительно 2 ч после введения дозы апоA-IV или его биологически активного аналога. В еще одном варианте осуществления секреция инсулина значительно восстанавливается до нормального уровня в течение приблизительно 8 до 12 ч. В еще одном дополнительном варианте осуществления лечение является эффективным для снижения уровня реактивного C-белка.

В одном варианте осуществления апоA-IV или его биологически активный аналог вводят системно. Системное введение апоA-IV или его аналога выбирают из группы, состоящей из перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и интраперитонеального введения.

В другом варианте осуществления раскрыта фармацевтическая композиция. В одном конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает апоA-IV или его биологически активный аналог. В другом варианте осуществления, апоA-IV или его аналог получены для введения субъекту для лечения T2DM. В данном конкретном варианте осуществления способ лечения T2DM у субъекта, нуждающегося в этом, также обеспечивается, где способ включает введение эффективного количества фармацевтической композиции субъекту.

"Аполипопротеин A-IV" (также упоминаемый в данном контексте как "апоA-IV") относится к апоA-IV млекопитающего и включает полноразмерный апоA-IV и биологически активные фрагменты апоA-IV. Полноразмерный человеческий апоA-IV представляет собой белок из 376 аминокислот (SEQ ID NO. 1), аминокислотная последовательность которого показана на фиг. 15; аминокислотная последовательность полноразмерного мышьяного апоA-IV (SEQ ID NO. 2) показана на фиг. 16. Также термин "аполипопротеин A-IV" охватывает известные аналоги, в которых глицин добавлен к N-концу аполипопротеина A-IV полноразмерной человеческой последовательности (SEQ ID NO. 3, как показано на фиг. 17), и его аналоги, имеющие консервативные замены для N-концевого глицина (такие как аланин и валин). "Аполипопротеин A-IV" также включает его полиморфные формы, в том числе T347S, Q360H или E165K замены для человеческой последовательности, представленной SEQ ID NO. 1 или соответствующих положений SEQ ID NO. 3. Таким образом, "аполипопротеин A-IV" включает белок SEQ ID NO. 4, показан на фиг. 18.

Биологически активный аналог аполипопротеина A-IV имеет по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности к аполипопротеину A-IV. Как описано в предыдущем абзаце, аполипопротеин A-IV

включает полноразмерный аполипопротеин A-IV млекопитающих (например, человека или млекопитающего), его полиморфные формы, белок SEQ ID NO. 3 и 4 и биологически активные фрагменты любого из вышеуказанных. Аминокислотные вариации в биологически активных аналогах предпочтительно имеют консервативные замены по отношению к последовательностям дикого типа. "Консервативная замена" заключается в замене аминокислоты на другую аминокислоту, которая имеет тот же чистый электронный заряд и приблизительно тот же размер и форму. Аминокислотные остатки с алифатическими или замещенными алифатическими боковыми цепями аминокислот имеют приблизительно такой же размер, где общее количество углерода и гетероатомов в их боковых цепях различаются не более чем приблизительно на 4. Они имеют приблизительно одинаковую форму, где количество ответвлений в их боковых цепях различается не более чем на один. Аминокислотные остатки с фенилом или замещенными фенильными группами в их боковых цепях, считается, имеют приблизительно такой же размер и форму. Ниже перечислены пять групп аминокислот. Замена аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком из той же группы приводит к консервативной замене:

группа I: глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, цистеин и аминокислоты не природного происхождения с C₁-C₄ алифатическими или C₁-C₄ гидроксилзамещенными алифатическими боковыми цепями (неразветвленные или с одной разветвленной цепью);

группа II: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота и аминокислоты не природного происхождения с C₁-C₄ алифатическими боковыми цепями, замещенными карбоновой кислотой (неразветвленные или одной точкой разветвления);

группа III: лизин, орнитин, аргинин и аминокислоты не природного происхождения с C₁-C₄ алифатическими боковыми цепями, замещенными амином или гуанидином (неразветвленные или одной точкой разветвления);

группа IV: глутамин, аспарагин и аминокислоты не природного происхождения с C₁-C₄ алифатическими боковыми цепями, замещенными амидом (неразветвленные или одной точкой разветвления);

группа V: фенилаланин, фенилглицин, тирозин и триптофан.

Аполипопротеин A-IV или его биологически активный аналог может быть гликозилированным или негликозилированным. Получение рекомбинантного негликозилированного человеческого и мышинного аполипопротеина A-IV описано в примере 11. Полинуклеотидная последовательность полноразмерного человеческого аполипопротеина дикого типа (SEQ ID NO. 1) показана как SEQ ID NO. 4 на фиг. 18. Аполипопротеин A-IV, применяемый в примерах 1-10, является негликозилированным. апоA-IV может быть получен согласно способу, известному в области молекулярной биологии. Например, апоA-IV может быть получен с помощью общепринятых методов молекулярного клонирования.

Аполипопротеин A-IV нокаутная мышь, использованная в примерах, была получена согласно методикам, описанным в J Lipid Res. 1997 Sep;38(9): 1782-94, все содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

В одном конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция может также содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители включают широкий выбор известных разбавителей (например, растворителей), наполнителей, продлевающих веществ, связывающих веществ, суспендирующих веществ, дезинтегрантов, сурфактантов, лубрикантов, вспомогательных веществ, смачивающих веществ и тому подобное, обычно применяемых в данной области. Фармацевтическая композиция является предпочтительно водной, т.е. представляет собой жидкую композицию, и предпочтительно содержит апиогенную воду. Данные носители могут применяться отдельно или в сочетании в зависимости от формы фармацевтического препарата. Полученный препарат может включать, при необходимости, один или несколько стабилизирующих веществ, буферы, консерванты, красители, отдушки, ароматизаторы и тому подобное, которые широко используются в области фармацевтических препаратов. Аполипопротеин A-IV или его биологически активный аналог может быть получен в виде лекарственной формы, выбранной из группы, состоящей из таблеток, капсул, гранул, пилюль, инъекций, растворов, эмульсий, суспензий и сиропа. Форма и путь введения фармацевтической композиции не ограничены и могут быть соответственно выбраны. Например, таблетки, капсулы, гранулы, пилюли, сиропы, растворы, эмульсии и суспензии могут вводиться перорально. Кроме того, инъекции (например, подкожные, внутривенные, внутримышечные и интраперитонеальные) можно вводить внутривенно либо отдельно или в сочетании с обычным наполнителем, содержащим глюкозу, аминокислоту и/или подобное, или можно отдельно вводить внутримышечно, внутривожно, подкожно и/или интраперитонеально.

Заявленная фармацевтическая композиция для лечения T2DM может быть получена согласно известным способам в области фармацевтики подобного рода с использованием фармацевтически приемлемого носителя. Например, пероральные формы, такие как таблетки, капсулы, гранулы, пилюли и подобное, готовят согласно известным методикам с использованием наполнителей, таких как сахароза, лактоза, глюкоза, крахмал, маннитол и подобное; связывающих веществ, таких как сироп, арабийская камедь, сорбит, трагакант, метилцеллюлоза, поливинилпирролидон и подобное; дезинтегрантов, таких как крахмал, карбоксиметилцеллюлоза или ее кальциевая соль, микрокристаллическая целлюлоза, полиэтиленгликоль и тому подобное; лубрикантов, таких как тальк, стеарат магния, стеарат кальция, ди-

оксид кремния и подобное; и смачивающих веществ, таких как лаурат натрия, глицерин и подобное.

Инъекции, растворы, эмульсии, суспензии, сиропы и тому подобное могут быть получены согласно известным способам с использованием подходящих растворителей для растворения активного ингредиента, таких как этиловый спирт, изопропиловый спирт, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, полиэтиленгликоль, кунжутное масло и подобное; сурфактантов, таких как эфир сорбита и жирной кислоты, полиоксиэтиленовый эфир сорбита и жирной кислоты, полиоксиэтиленовый эфир жирной кислоты, полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло, лецитин и подобное; суспендирующих веществ, таких как производные целлюлозы, в том числе натрий-карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза и подобное, природная камедь, включая трагакант, аравийскую камедь и подобное; и консервантов, таких как эфиры пара-гидроксibenзойной кислоты, бензалконий хлорид, соли сорбиновой кислоты и тому подобное.

Доля активного ингредиента, который должен содержаться в заявленной фармацевтической композиции для лечения диабета, может быть соответственно выбран из широкого диапазона.

В одном конкретном варианте осуществления субъектом, нуждающемся в лечении T2DM, является млекопитающее. Млекопитающее может быть выбрано из группы, состоящей из людей, низших приматов, собак, кошек, мышей, коров, лошадей, свиней и зайцеобразных. В одном конкретном варианте осуществления млекопитающим является человек. В другом варианте осуществления апоA-IV или его биологически активный аналог может быть введен субъекту для лечения T2DM, страдающим ожирением. Кроме того, апоA-IV может быть введен субъекту для лечения T2DM, не страдающим от ожирения.

Как показано на фиг. 1, в еще одном варианте осуществления раскрыто устройство 1. В одном варианте осуществления устройство 1 включает резервуар 10 с фармацевтической композиции, ранее рассмотренной выше. В еще одном варианте осуществления, резервуар 10 содержит флакон 12. Флакон 12 может быть выполнен из любого материала, который не ингибирует действие фармацевтической композиции. Например, флакон 12 может содержать стекло и/или пластик. Кроме того, сосуд 12 может содержать поддающуюся прокалыванию перегородку 14, через которую фармацевтическая композиция может быть удалена. Применяемая перегородка 14 флакона прокалывается с помощью иглы 22 шприца 20, фармацевтическая композиция удаляется с помощью шприца 20 из флакона 12, и фармацевтическую композицию вводят путем инъекции нуждающемуся субъекту.

Примеры

Следующие неограничивающие примеры иллюстрируют способы настоящего изобретения.

Пример 1. Нарушение толерантности к глюкозе у апоA-IV нокаутных мышей.

Описание опыта.

Были получены самцы апоA-IV нокаутных (далее "КО") мышей. Мыши дикого типа (далее "WT") служили в качестве контроля. апоA-IV КО и WT мыши были получены из колонии, хранящейся в Университете Цинциннати (Cincinnati, OH). апоA-IV КО и WT мышей кормили диетическим кормом. Перед проведением тестов на толерантность к глюкозе апоA-IV КО мышей и WT мышей не кормили 5 ч. В тестах толерантности к глюкозе апоA-IV КО мышам и WT мышам вводили интраперитонеально глюкозу в дозе приблизительно 2 мг/г массы тела и измеряли глюкозу в плазме в приблизительно 0, 15, 30, 60 и 120 минут после введения глюкозы. Тесты на толерантность к глюкозе проводили дважды, один раз в три месяца и еще раз в шестнадцать месяцев.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 2, апоA-FV КО мыши имели нарушение толерантности к глюкозе по сравнению с WT мышами. В частности, фиг. 2 показывает, что уровни глюкозы в плазме у WT мышей были ниже, чем уровни глюкозы в плазме у апоA-IV КО мышей в течение 2 ч после интраперитонеального введения глюкозы. Не ограничиваясь теорией, вывод этих исследований в том, что апоA-IV является необходимым для нормального гомеостаза глюкозы (по крайней мере, у самцов). Кроме того, как показано на фиг. 3, апоA-IV КО мыши показали увеличение нарушения толерантности к глюкозе, когда подвергались испытанию в шестнадцать месяцев. В частности, фиг. 3 показывает, что уровни глюкозы в плазме у апоA-IV мышам, подвергающихся испытаниям в шестнадцать месяцев, были выше, чем уровни глюкозы в плазме в апоA-IV КО, подвергающихся испытаниям в три месяца. Не ограничиваясь теорией, вывод этих исследований в том, что толерантность к глюкозе апоA-IV КО мышей ухудшается с возрастом.

Эксперимент на самках мышей дикого типа и апоA-IV нокаутных мышей.

Самки апоA-IV мышей дикого типа и нокаутных мышей подвергались такому же интраперитонеальному тесту толерантности к глюкозе, который применяли для самцов апоA-IV КО и WT мышей, как описано в начале данного примера 1. Результаты показаны на фиг. 11. Самки апоA-IV^{-/-} мышей, которых подвергали интраперитонеальному введению глюкозы, имели повышенные уровни глюкозы в плазме по сравнению с самками WT животных, но это не является статистически значительной разницей. С другой стороны, самцы имели значительную разницу между WT и КО животными.

Пример 2. Восстановление толерантности к глюкозе у апоА-IV нокаутных мышей.

Описание опыта.

После демонстрации того, что у апоА-IV КО мышей непереносимость глюкозы, осуществляли ряд обширных исследований для определения восстановления толерантности к глюкозе до нормального уровня у апоА-IV КО мышей введением апоА-IV. Кроме того, ряд обширных исследований осуществляли для определения не только количества апоА-IV для введения, но также оптимального времени для введения апоА-IV до проведения тестов на толерантность к глюкозе.

Самцам апоА-IV КО мышей вводили интраперитонеально апоА-IV в дозе приблизительно 0.25, 0.5, 1 и 2 мкг/г на массу тела. апоА-IV КО мышам также вводили интраперитонеально физиологический раствор, который служил в качестве контроля. После введения мышам апоА-IV или физиологического раствора, тесты на толерантность к глюкозе проводили в три месяца, как описано ранее. В частности, тесты на толерантность к глюкозе проводили приблизительно через 2 ч после введения апоА-IV или физиологического раствора. Экспериментальные результаты показали, что оптимальное время для восстановления толерантности к глюкозе у апоА-IV КО мышей для введения апоА-IV приблизительно 2 ч до проведения теста на толерантность к глюкозе.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 4, введение апоА-IV апоА-IV КО мышам восстанавливает толерантность к глюкозе до нормального уровня. В частности, фиг. 4 показывает, что уровни глюкозы в плазме у апоА-IV КО мышей, которым вводили апоА-IV, были ниже, чем уровни глюкозы в плазме у апоА-IV КО мышей, которым вводили физиологический раствор. Кроме того, как показано на фиг. 4, уровни глюкозы в плазме у апоА-IV КО мышей, которым вводили апоА-IV, были самыми низкими у апоА-IV КО мышей, которым вводили высокие дозы апоА-IV; аналогично, уровни глюкозы в плазме у апоА-IV мышей, которым вводили апоА-IV, были самыми высокими у апоА-IV КО мышей, которым вводили высокие дозы апоА-IV.

Соответственно было обнаружено, что степень улучшения толерантности к глюкозе зависит от дозы вводимого апоА-IV, более высокие дозы приводят к улучшению толерантности к глюкозе.

Пример 3. Специфичность апоА-IV в восстановлении толерантности к глюкозе у апоА-IN нокаутных мышей.

Описание опыта.

Для того чтобы оценить специфичность апоА-IV, авторы изобретения вводили аполипопротеин AI (далее "апоА-I") апоА-IV КО мышам. АпоА-I представляет собой белок, вырабатываемый маленькими эпителиальными клетками кишечника, которые также производят апоА-IV. апоА-I разделяет многие функции апоА-IV. апоА-IV КО мышам вводили интраперитонеально апоА-I в дозе 1 мкг/г массы. апоА-IV КО мышам также вводили интраперитонеально физиологический раствор, который служил в качестве контроля. После введения апоА-I или физиологического раствора, проводили тест на толерантность к глюкозе в три месяца, как описано ранее. В частности, тесты на толерантность к глюкозе проводили приблизительно 2 ч после введения апоА-I или физиологического раствора.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 5, введение апоА-I апоА-IV КО мышам не восстанавливает или улучшает толерантность к глюкозе.

Пример 4. Механизм восстановления толерантности к глюкозе у апоА-IV нокаутных мышей.

Описание опыта.

Для того чтобы оценить механизм, с помощью которого апоА-IV улучшает толерантность к глюкозе у апоА-IV КО мышей, авторы изобретения измеряли секрецию инсулина, индуцированную глюкозой, у апоА-IV КО мышей. В частности, авторы изобретения измеряли секрецию инсулина, индуцированную глюкозой, в ходе тестов на толерантность к глюкозе в три месяца, как описывалось ранее. В данных исследованиях апоА-IV КО мышам вводили интраперитонеально мышинный апоА-IV в дозе приблизительно 1 мкг/г массы за 2 ч до проведения тестов на толерантность к глюкозе. апоА-IV мышам вводили физиологический раствор приблизительно за 2 ч до проведения тестов на толерантность к глюкозе, который служил в качестве контроля.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 6, фаза I секреции инсулина отсутствовала у апоА-IV КО мышей, которым вводили физиологический раствор. Кроме того, как показано на фиг. 6, фаза I секреции инсулина была восстановлена у апоА-IV КО мышей, когда вводили интраперитонеально апоА-IV за 2 ч до проведения тестов на толерантность к глюкозе.

Пример 5. Эффективность апоА-IV у апоА-IV нокаутных мышях и мышях дикого типа на рационе с высоким содержанием жира.

Описание опыта.

апоА-IV КО и WT мышей постоянно кормили с высоким содержанием жира полуочищенным обогащенным полноценным экспериментальным рационом (AIN-93M), приобретенным из Dyets (Bethlehem, PA) в течение 10 дней. Рацион с высоким содержанием жира содержит приблизительно 20 г жира (т.е. приблизительно 19 г молочного жира и 1 г соевого масла для обеспечения незаменимых жирных кислот)

на 100 г рациона. апоА-IV КО и WT мышей помещали в отдельные клетки с подстилкой из сердцевин кукурузных початков в температуро- (приблизительно $22\pm 1^\circ\text{C}$) и свето- (приблизительно 12 ч свет/12 темнота) контролируемого вивария. Тесты на толерантность к глюкозе осуществляли в три месяца, как описано ранее. До осуществления тестов на толерантность к глюкозе, апоА-IV КО мышей и WT мышей не кормили в течение 5 ч. В тестах на толерантность к глюкозе апоА-IV КО мышам и WT мышам вводили интраперитонеально глюкозу в дозе приблизительно 2 мг/г массы тела.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 7, апоА-IV КО мыши показывают большее нарушение толерантности к глюкозе по сравнению с WT мышами. В частности, фиг. 7 показывает, что уровни глюкозы в плазме крови у WT мышей были ниже, чем уровни глюкозы в плазме крови у апоА-IV КО мышей в течение 2 ч после введения глюкозы.

Пример 6. Восстановление толерантности к глюкозе у апоА-IV нокаутных мышей и мышей дикого типа на рационе с высоким содержанием жира.

Описание опыта.

Ряд исследований были выполнены относительно введения апоА-IV апоА-IV КО и WT мышам на рацион с высоким содержанием жира в течение 14 недель в три месяца (20% по массе жира, 19% молочного жира и 1% сафлорового масла). В частности, апоА-IV КО и WT мышам вводили интраперитонеально мышинный апоА-IV в дозе приблизительно 1 мкг/г массы тела. апоА-IV КО и WT мышам также вводили интраперитонеально физиологический раствор, который служил в качестве контроля. После введения апоА-IV или физиологического раствора проводили тесты на толерантность к глюкозе. В частности, тесты на толерантность к глюкозе проводили через 2 ч после введения апоА-IV или физиологического раствора.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 8, введение апоА-IV у апоА-IV КО мышей значительно улучшает толерантность к глюкозе. В частности, фиг. 8 показывает, что уровни глюкозы в плазме у апоА-IV КО мышей, которым вводили апоА-IV, были ниже, чем уровни глюкозы в плазме у апоА-IV КО мышей, которым вводили физиологический раствор. Хотя данные не включены в настоящую заявку, было также обнаружено, что введение апоА-IV WT мышам, питающихся кормом с высоким содержанием жира, также значительно улучшает толерантность к глюкозе.

Пример 7. Восстановление толерантности к глюкозе у мышей с T2DM.

Описание опыта.

Для подтверждения того, что апоА-IV является эффективным в обеспечении толерантности к глюкозе у животных с T2DM, гетерозиготные КК Cg-A/J (далее "Cg-A/J") мыши были получены из Jackson лаборатории (Bar Harbor, Maine). У Cg-A/J мышей развивается гипергликемия, гиперинсулиномия, ожирение и нарушение толерантности к глюкозе на восьмой неделе. Основной причиной диабета у данных мышей является резистентность к инсулину, вызванная полигенным взаимодействием с A^y мутацией, которая кодирует агутти-связанный белок и антагонист рецептора меланокортина-IV. Cg-A/J мыши принимали диетический корм. Кроме того, было отмечено увеличение глюкозы в крови от десяти до сорока-пятидесяти недель кормления диетическим кормом.

В четырнадцать недель Cg-A/J мышам вводили либо мышинный апоА-IV (приблизительно 1 мкг/г массы тела) или физиологический раствор (в качестве контроля) путем интраперитонеального введения. Глюкозу в плазме крови затем определяли в приблизительно 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11 и 24 ч.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 9, апоА-IV оказывает влияние на снижение уровня сахара в крови Cg-A/J мышей по сравнению с физиологическим контролем. При этом авторами было изучено, что Cg-A/J мыши, которым вводили физиологический раствор, поддерживали на постоянном уровне глюкозу в крови в течение 24-часового периода исследования, Cg-A/J мыши, которым вводили апоА-IV, показывали снижение глюкозы в плазме дольше 10 ч, а в течение большей части этого периода уровень глюкозы в плазме был сопоставим с C57BL/6J животными. Из данного исследования авторы изобретения сделали вывод, что введение апоА-IV является эффективным в снижении глюкозы в плазме в Cg-A/J мышях.

Пример 8. Уровень сывороточного амилоидного Р-компонента у апоА-IV КО, апоА-I КО и WT мышей.

Описание опыта.

Ряд исследований проводили в связи с определением уровня сывороточного амилоидного Р-компонента (далее "SAP") у апоА-IV КО, апоА-I КО и WT мышей на антерогенной диете. апоА-IV КО, апоА-I КО и WT мышей получали из университета Цинциннати. SAP представляет собой форму сывороточного амилоидного Р-компонента (далее "AP"), 25 кДа пентамерный белок, впервые идентифицированный как пятиугольный компонент патологического отложения *in vivo*, называемый амилоидом. SAP ведет себя подобно реактивному С-белку у людей. В частности, уровень SAP в плазме у апоА-IV КО, апоА-I КО и WT мышей определяли в апоА-IV КО, апоА-I КО и WT мышях после 12 недель антерогенной диеты. Уровень SAP в плазме определяли с помощью анализа вестерн-блоттинга.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 10, уровень SAP у апоA-IV КО мышей (мышь с соответствующими номерами 1, 8 и 10) увеличился относительно уровня SAP у апоA-IKO мышей (мышь с соответствующими номерами 28, 29 и 30) и WT мышей (мышь с соответствующими номерами 19, 20 и 25).

В целях написания и определения настоящего изобретения следует отметить, что термины "приблизительно" и "значительно" используются в данном контексте для представления присущей степени неопределенности, которая может быть отнесена к любому количественному сравнению, параметру, измерению или другим представлениям. Термины "приблизительно" и "значительно" также используются в данном контексте для представления степени, с помощью которой количественный состав может изменяться в зависимости исходного состояния, не приводя к изменению основной функции объекта.

Приведенное выше описание и чертежи должны рассматриваться только как наглядные примеры вариантов осуществления, которые достигаются отличительными признаками и преимуществами настоящего изобретения. Изменения и замены описанных отличительных признаков и этапов могут быть сделаны в пределах намерения и объема настоящего изобретения. Соответственно изобретение не следует рассматривать как ограниченное вышеприведенным описанием и чертежами, но ограничивается только объемом формулы изобретения.

Пример 8. Человеческий апоA-IV снижает уровни глюкозы в крови у мышей дикого типа, подвергающихся интраперитонеальному тестированию толерантности к глюкозе.

Описание опыта.

Исследования осуществляли для определения влияния введения человеческого апоA-IV мышам дикого типа на уровни глюкозы в крови у мышей, подвергающихся тестированию толерантности к глюкозе.

Трехмесячным мышам дикого типа вводили интраперитонеально человеческий апоA-IV в дозе приблизительно 1 мкг/г. В качестве контроля другой группе мышей дикого типа вводили интраперитонеально физиологический раствор. После введения человеческого апоA-IV или физиологического раствора проводили тесты на толерантность к глюкозе.

В частности, тесты на толерантность к глюкозе проводили через приблизительно 2 ч после введения апоA-IV или физиологического раствора и после 5-часового голодания. Кровь из хвоста собирали и измеряли глюкометром.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 12, человеческий апоA-IV эффективен в снижении глюкозы в крови у мышей дикого типа, подвергавшихся тестированию на толерантность к глюкозе.

Пример 9. Влияние мышинового апоA-IV у самок мышей дикого типа, подвергающихся исследованию на толерантность к глюкозе.

Описание опыта.

Исследования осуществляли для определения влияния введения мышинового апоA-IV самкам мышей дикого типа на уровни глюкозы в крови у мышей, подвергающихся исследованию на толерантность к глюкозе.

Трехмесячным самкам мышей дикого типа вводили интраперитонеально мышинный апоA-IV в дозе приблизительно 1 мкг/г массы. В качестве контроля другой группе самок мышей дикого типа вводили интраперитонеально физиологический раствор. После введения человеческого апоA-IV или физиологического раствора, проводили тест на толерантность к глюкозе. В частности, тесты на толерантность к глюкозе проводили через приблизительно 2 ч после введения апоA-IV или физиологического раствора и после 5 ч голодания. Кровь из хвоста собирали и измеряли глюкометром.

Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 13, мышинный апоA-TV эффективен в снижении глюкозы в крови у самок мышей дикого типа, подвергающихся исследованию на толерантность к глюкозе.

Пример 10. Человеческий апоA-IV стимулирует высвобождение инсулина в человеческих островках.

Человеческие островки высокой степени очистки были предоставлены университетом Вирджинии, Aхон cells. Островки культивировали в RPMI 1640, содержащей 10% FBS и 11 mM глюкозу, при 37°C в увлажненной атмосфере из 95 и 5% CO₂ в течение 48 ч.

Четыре группы 50 IEQ островков затем предварительно инкубировали при 37°C в течение 1 ч в стандартном KRB (129 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES и 0.2% BSA), содержащем 3.0 mM глюкозу. Островки у первых двух групп затем инкубировали в стандартном KRB, содержащем 3.0 mM глюкозу, в течение 1 ч в присутствии или отсутствии 10 мкг/мл человеческого A-IV и далее инкубировали с 20 mM глюкозы в течение дополнительного часа в присутствии или отсутствии 10 мкг/мл человеческого A-IV. Островки в последних двух группах были инкубированы в 30 mM KRB (103.8 mM NaCl, 30 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES и 0.2% BSA) с добавлением 250 мкмоль/л диазоксида, содержащего 3.0 mM глюкозы, в течение 1 ч в присутствии или отсутствии 10 мкг/мл человеческого A-IV и далее

инкубировали с 20 мМ глюкозы в течение дополнительного 1 ч в присутствии или отсутствие 10 мкг/мл человеческого А-IV. Среду собирали в конце каждого 1-часового инкубирования. Уровни инсулина измеряли с помощью набора ELISE (Millipore).

Как можно увидеть на фиг. 14, когда человеческие островки максимально разрушены с помощью 30 мМ KCl с добавлением 250 мМ диазооксида, 10 мкг/мл hA-IV показывал значительное стимулирующее влияние на секрецию инсулина.

Пример 11. Получение негликозилированного апоА-IV.

Человеческий и мышинный апоА-IV кДНК, содержащиеся в плазмидном векторе pSP65 и сайте рестрикции Afl III, были созданы непосредственно на 5'-конце последовательности, кодирующей зрелый апоА-IV белок. Ген был вырезан из плазмидного вектора и лигирован в экспрессионный вектор pET30. Конструкцию трансфецировали в клетки E.Coli BL-21 (DE3) и выращивали в культурах Лурия-Бертани, дополненных канамицином (30 мкг/мл), при 37°C. После индукции синтеза апоА-IV белка в клетках клетки были собраны и обработаны ультразвуком. Белок апоА-IV из лизата очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке со смолой His-bind и диализа. Полученный белок апоА-IV разводили до конечной концентрации 1.0 мг/мл в физиологическом растворе.

Перечень последовательностей

<110> Университет оф Цинциннати
 ТСО, Патрик
 Дэвидсон, Шон
 ВУДС, Стивен
 ВАН, Фэй

<120> АПОЛИПОПРОТЕИН А-IV В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА

<130> 120946-00120

<140> РСТ/US2012/021802
 <141> 2012-01-19

<150> 61/434196
 <151> 2011-01-19

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 376
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe Ser
 1 5 10 15

Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His Leu Gln Lys Ser
 20 25 30

Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp Lys Leu Gly Glu
 35 40 45

Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu Val Pro Phe Ala
 50 55 60

Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu Lys Leu Lys Glu
 65 70 75 80

Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Leu Pro His
 85 90 95

Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu Arg Glu Leu Gln
 100 105 110

Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn Thr
 115 120 125

Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg Met
 130 135 140

Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu Arg
 145 150 155 160

Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu Glu
 165 170 175

Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys Ile
 180 185 190
 Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala Gln
 195 200 205
 Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe Gln
 210 215 220
 Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser Ala
 225 230 235 240
 Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg Gly
 245 250 255
 Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Ala Glu Leu
 260 265 270
 Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val Glu
 275 280 285
 Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu Gln
 290 295 300
 Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His Leu
 305 310 315 320
 Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn Ser Phe Phe Ser
 325 330 335
 Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu Ser Leu Pro Glu
 340 345 350
 Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Val
 355 360 365
 Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser
 370 375

<210> 2
 <211> 361
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<400> 2

Glu Val Thr Ser Asp Gln Val Ala Asn Val Val Trp Asp Tyr Phe Thr
 1 5 10 15
 Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu Gln Phe Gln Lys Thr
 20 25 30
 Asp Val Gln Gln Leu Ser Thr Leu Phe Ala Ser Thr Tyr Ala Asp Gly
 35 40 45

Val₅₀ His Asn Lys Leu Val₅₅ Pro Phe Val Val Gln Leu₆₀ Ser Gly His Leu
 Ala₆₅ Gln Glu Thr Glu Arg₇₀ Val Lys Glu Glu Ile₇₅ Lys Lys Glu Leu₈₀ Glu
 Asp Leu Arg Asp₈₅ Arg Lys Thr Gln Thr Phe₉₀ Gly Glu Asn Met Gln₉₅ Lys
 Leu Gln Glu His₁₀₀ Leu Lys Pro Tyr Ala₁₀₅ Val Asp Leu Gln Asp₁₁₀ Gln Ile
 Asn Thr Gln₁₁₅ Thr Gln Glu Met Lys₁₂₀ Leu Gln Leu Thr Pro₁₂₅ Tyr Ile Gln
 Arg Met₁₃₀ Gln Thr Thr Ile Lys₁₃₅ Glu Asn Val Asp Asn₁₄₀ Leu His Thr Ser
 Met₁₄₅ Met Pro Leu Ala Thr₁₅₀ Asn Leu Lys Asp Lys₁₅₅ Phe Asn Arg Asn Met₁₆₀
 Glu Glu Leu Lys Gly₁₆₅ His Leu Thr Pro Arg₁₇₀ Ala Asn Glu Leu Lys₁₇₅ Ala
 Thr Ile Asp Gln₁₈₀ Asn Leu Glu Asp Leu₁₈₅ Arg Arg Ser Leu Ala₁₉₀ Pro Leu
 Thr Val Gly₁₉₅ Val Gln Glu Lys Leu₂₀₀ Asn His Gln Met Glu₂₀₅ Gly Leu Ala
 Phe Gln₂₁₀ Met Lys Lys Asn Ala₂₁₅ Glu Glu Leu Gln Thr₂₂₀ Lys Val Ser Ala
 Lys₂₂₅ Ile Asp Gln Leu Gln₂₃₀ Lys Asn Leu Ala Pro₂₃₅ Leu Val Glu Asp Val₂₄₀
 Gln Ser Lys Val Lys₂₄₅ Gly Asn Thr Glu Gly₂₅₀ Leu Gln Lys Ser Leu₂₅₅ Glu
 Asp Leu Asn Arg₂₆₀ Gln Leu Glu Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg₂₇₀ Arg Thr
 Val Glu Pro₂₇₅ Met Gly Glu Met Phe₂₈₀ Asn Lys Ala Leu Val₂₈₅ Gln Gln Leu
 Glu Gln Phe Arg Gln Gln Leu₂₉₅ Gly Pro Asn Ser Gly₃₀₀ Glu Val Glu Ser
 His₃₀₅ Leu Ser Phe Leu Glu Lys Ser Leu Arg Glu₃₁₅ Lys Val Asn Ser Phe₃₂₀
 Met Ser Thr Leu Glu₃₂₅ Lys Lys Gly Ser Pro₃₃₀ Asp Gln Pro Gln Ala₃₃₅ Leu

Pro Leu Pro Glu Gln Ala Gln Glu Gln Ala Gln Glu Gln Ala Gln Glu
340 345 350

Gln Val Gln Pro Lys Pro Leu Glu Ser
355 360

<210> 3
<211> 377
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 3

Gly Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe
1 5 10 15

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His Leu Gln Lys
20 25 30

Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp Lys Leu Gly
35 40 45

Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu Val Pro Phe
50 55 60

Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu Lys Leu Lys
65 70 75 80

Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Leu Pro
85 90 95

His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu Arg Glu Leu
100 105 110

Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn
115 120 125

Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg
130 135 140

Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu
145 150 155 160

Arg Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu
165 170 175

Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys
180 185 190

Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala
195 200 205

Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe
210 215 220

Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser
 225 230 235 240
 Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg
 245 250 255
 Gly Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Ala Glu
 260 265 270
 Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val
 275 280 285
 Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu
 290 295 300
 Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His
 305 310 315 320
 Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn Ser Phe Phe
 325 330 335
 Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu Ser Leu Pro
 340 345 350
 Glu Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln
 355 360 365
 Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser
 370 375

<210> 4
 <211> 377
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (1)..(1)
 <223> X представляет собой G, A, V или отсутствует

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (166)..(166)
 <223> X представляет собой E или K

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (348)..(348)
 <223> X представляет собой T или S

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (361)..(361)
 <223> X представляет собой Q или N

<400> 4

Xaa Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp Asp Tyr Phe
 1 5 10 15

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His Leu Gln Lys
 20 25 30
 Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp Lys Leu Gly
 35 40 45
 Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu Val Pro Phe
 50 55 60
 Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu Lys Leu Lys
 65 70 75 80
 Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Leu Leu Pro
 85 90 95
 His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu Arg Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr Gln Val Asn
 115 120 125
 Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Thr Pro Tyr Ala Gln Arg
 130 135 140
 Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro His Ala Asp Xaa Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln Asn Val Glu
 165 170 175
 Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe Lys Val Lys
 180 185 190
 Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Tyr Ala
 195 200 205
 Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly Leu Thr Phe
 210 215 220
 Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile Ser Ala Ser
 225 230 235 240
 Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu Asp Val Arg
 245 250 255
 Gly Asn Leu Arg Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Ala Glu
 260 265 270
 Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Arg Val
 275 280 285
 Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Met Glu
 290 295 300

Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val Glu Gly His
305 310 315 320

Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn Ser Phe Phe
325 330 335

Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Xaa Leu Ser Leu Pro
340 345 350

Glu Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Xaa Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln
355 360 365

Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser
370 375

<210> 5
<211> 1125
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 5
gtcagtgtg accaggtggc cacagtgatg tgggactact tcagccagct gagcaacaat 60
gccaaggagg ccgtggaaca tctccagaaa tctgaactca cccagcaact caatgccctc 120
ttccaggaca aacttggaga agtgaacct tacgcaggtg acctgcagaa gaagctggtg 180
ccctttgcc cgcagctgca tgaacgcctg gccaaggact cggagaaact gaaggaggag 240
attggaagg agctggagga gctgagggcc cggctgtgc cccatgccaa tgaggtgagc 300
cagaagatcg gggacaacct gcgagagctt cagcagcgcc tggagcccta cgcggaccag 360
ctgcgacccc aggtcaacac gcaggccgag cagctgcggc gccagctgac cccctacgca 420
cagcgcatgg agagagtgtc gcgggagaac gccgacagcc tcaggccctc gctgaggccc 480
cacgccgacg agctcaaggc caagatcgac cagaacgtgg aggagctcaa gggacgcctt 540
acgccctacg ctgacgaatt caaagtcaag attgaccaga ccgtggagga gctgcgccgc 600
agcctggctc cctatgtctc ggacacgcag gagaagctca accaccagct tgagggcctg 660
accttccaga tgaagaagaa cgccgaggag ctcaaggcca ggatctcggc cagtgccgag 720
gagctgcggc agaggctggc gcccttgccc gaggacgtgc gtggcaacct gaggggcaac 780
accgaggggc tgcagaagtc actggcagag ctgggtgggc acctggacca gcagggtggag 840
gagttccgac gccgggtgga gccctacggg gaaaacttca acaaagccct ggtgcagcag 900
atggaacagc tcaggcagaa actgggcccc catgcggggg acgtggaagg ccacctgagc 960
ttcttgagga aggacctgag ggacaaggtc aactccttct tcagcacctt caaggagaaa 1020
gagagccagg acaagactct ctccctccct gagctcgagc aacagcagga acagcagcag 1080
gagcagcagc aggagcaggt gcagatgtgt gcccctttgg agagc 1125

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения сахарного диабета II типа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

X₁EV SADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLV PFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADX₂LKAKIDQNVEELKGR LTPY ADEFKVKIDQTV EELRRSLAPYAQDTQEKLNH
QLEGLTFQMKN AEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNT EQLQKSLAE
LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGP HAGDVEGHLSFLEK
DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX₃LSLPELEQQQEQQ₄QEQQQEQVQMLAPLES
(SEQ ID NO. 4)

где X₁ представляет собой G, A или V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

2. Способ снижения уровня глюкозы в крови у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет

собой

X₁EV SADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLV PFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADX₂LKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNH
QLEGLTFQMKNNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEK
DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX₃LSLPELEQQQEQQX₄QEQQQEQQVQMLAPLES
(SEQ ID NO. 4)

где X₁ представляет собой G, A или V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

3. Способ восстановления толерантности к глюкозе у субъекта до нормального уровня, включающий введение субъекту эффективного количества аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

X₁EV SADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLV PFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADX₂LKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNH
QLEGLTFQMKNNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEK
DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX₃LSLPELEQQQEQQX₄QEQQQEQQVQMLAPLES
(SEQ ID NO. 4)

где X₁ представляет собой G, A или V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что субъектом является человек.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность аполипопротеина A-IV представляет собой

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSEL TQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLV PFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQ
LEGLTFQMKNNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAEL
GGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEKD
LRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID
NO. 3).

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV является гликозилированным.

7. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV является негликозилированным.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV вводят системно.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что системное введение аполипопротеина A-IV выбирают из группы, состоящей из перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и внутрибрюшинного введения.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV вводят в дозе от 1 до 10 мкг/г.

11. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV вводят в дозе от 0.25 до 2 мкг/г.

12. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV вводят в дозе 1 мкг/г.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV вводят один раз в день.

14. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что аполипопротеин A-IV вводят 2 раза в день.

15. Фармацевтическая композиция для лечения сахарного диабета II типа, содержащая эффективное

количество аполиопротейна А-IV, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, где аминокислотная последовательность аполиопротейна А-IV представляет собой

X₁EV SADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADX₂LKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTV EELRRSLAPYAQDTQEKLNH
QLEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEK
DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX₃LSLPELEQQEQQ₄EQQQEQVQMLAPLES
(SEQ ID NO. 4)

где X₁ представляет собой G, A или V;

X₂ представляет собой E или K;

X₃ представляет собой T или S и

X₄ представляет собой Q или H.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, которая представляет собой жидкую композицию.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15 и 16, которая представляет собой водную композицию.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, которая свободна от пирогенов.

19. Фармацевтическая композиция по п.15, в которой аминокислотная последовательность аполиопротейна А-IV представляет собой

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTV EELRRSLAPYAQDTQEKLNHQ
LEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAEL
GGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEKD
LRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQEQQ₄EQQQEQVQMLAPLES (SEQ ID
NO. 3).

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15 и 19, в которой аполиопротейн А-IV является гликозилированным.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15 и 19, в которой аполиопротейн А-IV является негликозилированным.

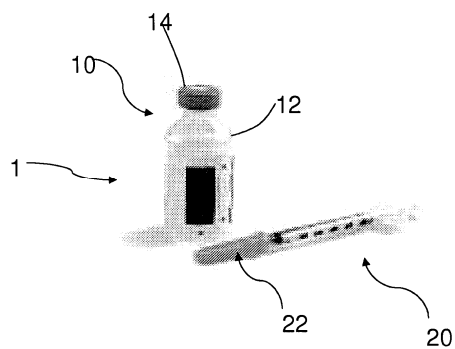
22. Способ лечения сахарного диабета II типа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп.15-21.

23. Противодиабетический полипептид аполиопротейна А-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

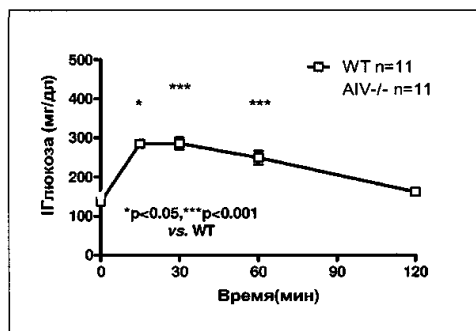
GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTV EELRRSLAPYAQDTQEKLNHQ
LEGLTFQMKKNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAEL
GGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEKD
LRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQEQQ₄EQQQEQVQMLAPLES (SEQ ID
NO. 3).

24. Полипептид по п.23, который является гликозилированным.

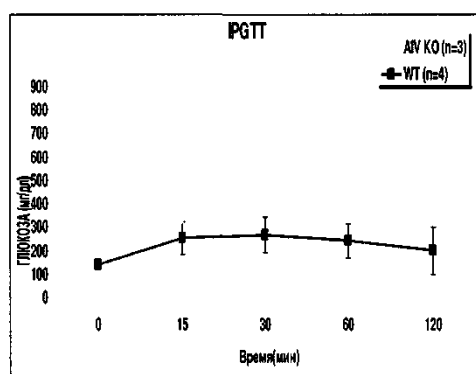
25. Полипептид по п.23, который является негликозилированным.



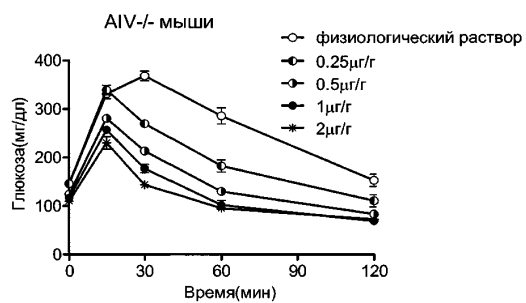
Фиг. 1



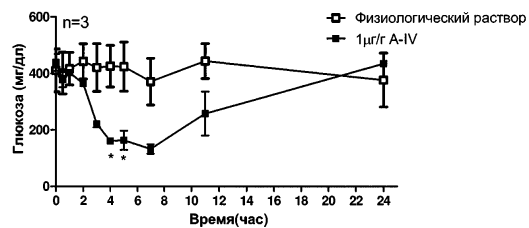
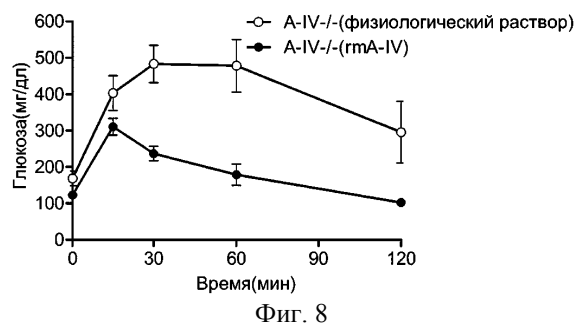
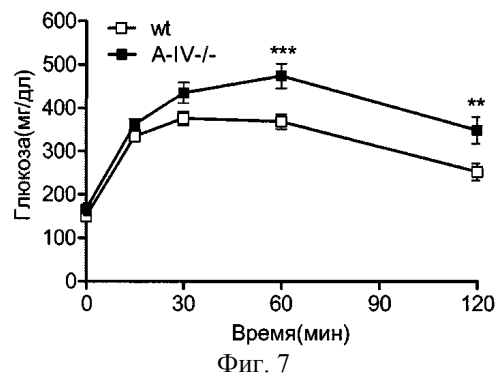
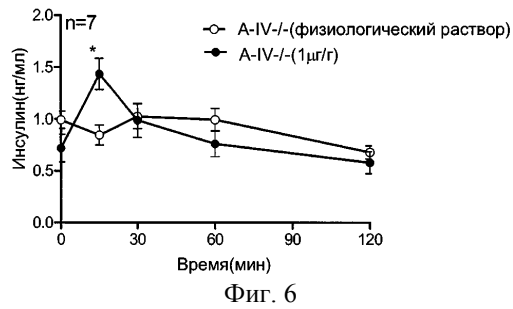
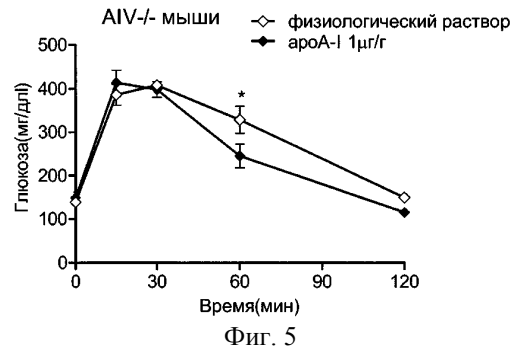
Фиг. 2

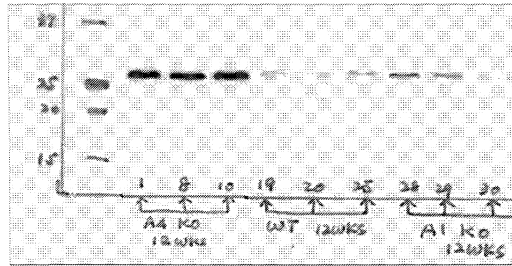


Фиг. 3



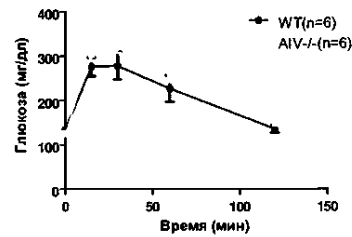
Фиг. 4





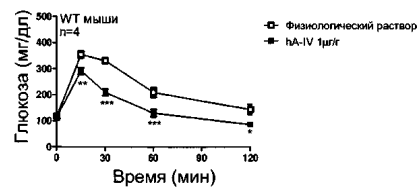
Фиг. 10

IPGTT у самок WT и AIV-KO мышей



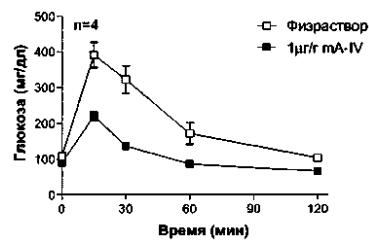
Фиг. 11

IPGTT у WT мышей после интраперитонеальной инъекции человеческого A-IV или физ раствора



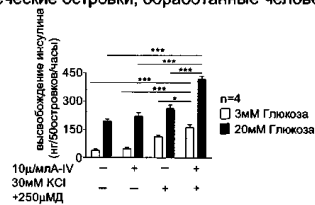
Фиг. 12

Самки WT мышей



Фиг. 13

Человеческие островки, обработанные человеческим A-IV



Когда человеческие островки разрушены 30мМ KCl с добавлением 250μМ Дз, 10μг/мл hA-IV показывает значительный стимулирующий эффект на секрецию инсулина.

Фиг. 14

028218

EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVPPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGD
NLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQAS
LRPHADELKAKIDQNVVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQE
KLNHQLEGLTFQMKNNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTGL
QKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDV
EGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQEQQEQV
QMLAPLES

SEQ ID NO. 1

Фиг. 15

EVTSDQVANVVWDYFTQLSNNAKEAVEQFQKTDVQQLST
LFASTYADGVHNKLVPFVVQLSGHLAQETERVKKEIKKEL
EDLRDRKTQTFGENMQKLQEHLKPYAVDLQDQINTQTQE
MKLQLTPYIQRMQTTIKENVNDNLHTSMPLATNLKDKFN
RNMEELKGHLTPRANELKATIDQNLEDLRRSLAPLTVGVQ
EKLNHQMEGLAFQMKNNAEELQTKVSAKIDQLQKNLAPL
VEDVQSKVKGNTEGLQKSLEDLNRQLEQQVEEFRRRTVEP
MGEMFNKALVQQLEQFRQQLGPNSGEVESHLSFLEKSLRE
KVNSFMSTLEKKGSPDQPQALPLPEQAQEQQAQEQVQ
PKPLES

SEQ ID NO. 2

Фиг. 16

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKL
GEVNTYAGDLQKKLVPPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV
SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENA
DSLQASLRPHADELKAKIDQNVVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPY
AQDTQEKLNHQLEGLTFQMKNNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLR
GNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLG
PHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTSLPELEQQQEQQQE
QQEQVQMLAPLES

SEQ ID NO. 3

Фиг. 17

X₁EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKL
GEVNTYAGDLQKKLVPPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV
SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENA
DSLQASLRPHADX₂LKAKIDQNVVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAP
YAQDTQEKLNHQLEGLTFQMKNNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLR
GNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLG
PHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX₃LPELEQQQEQQX₃
QEQQEQVQMLAPLES

X₁ is G, A, V or absent

X₂ is E or K

X₃ is T or S

X₄ is Q or H

SEQ ID NO. 4

Фиг. 18

GTCAGTGCTGACCAGGTGGCCACAGTGATGTGGGACTACTTCAGCC
AGCTGAGCAACAATGCCAAGGAGGCCGTGGAACATCTCCAGAAATCTGAA
CTCAGCCAGCAACTCAATGCCCTCTCCAGGACAAACTTGGAGAAGTGAAC
ACTTACGCAGGTGACCTGCAGAAGAAGCTGGTGCCCTTTGCCACCGAGCT
GCATGAACGCCTGGCCAAGGACTCGGAGAACTGAAGGAGGAGATTGGGA
AGGAGCTGGAGGAGCTGAGGGCCCGGCTGCTGCCCCATGCCAATGAGGT
GAGCCAGAAGATCGGGGACAACCTGCGAGAGCTTCAGCAGCGCCTGGAG
CCCTACGCGGACCAGCTGCGCACCCAGGTCAACACGCAGGCCGAGCAGC
TGCGGCGCCAGCTGACCCCTACGCACAGCGCATGGAGAGAGTGCTGCG
GGAGAACGCCGACAGCCTGCAGGCCTCGCTGAGGCCCCACGCCGACGAG
CTCAAGGCCAAGATCGACCAGAACGTGGAGGAGCTCAAGGGACGCCTTAC
GCCCTACGCTGACGAATTCAAAGTCAAGATTGACCAGACCGTGGAGGAGC
TGCGCCGACGCTGGCTCCCTATGCTCAGGACACGCAGGAGAAGCTCAAC
CACCAGCTTGAGGGCCTGACCTTCCAGATGAAGAAGAACGCCGAGGAGCT
CAAGGCCAGGATCTCGGCCAGTGCCGAGGAGCTGCGGCAGAGGCTGGCG
CCCTTGCGCCGAGGACGTGCGTGGCAACCTGAGGGGCAACACCGAGGGGC
TGCAGAAGTCACTGGCAGAGCTGGGTGGGCACCTGGACCAGCAGGTGGA
GGAGTTCCGACGCCGGGTGGAGCCCTACGGGGAAACTTCAACAAAGCCC
TGGTGACAGAGATGGAACAGCTCAGGCAGAACTGGGCCCCCATGCGGG
GGACGTGGAAGGCCACCTGAGCTTCTGGAGAAGGACCTGAGGGACAAG
GTCAACTCCTTCTCAGCACCTTCAAGGAGAAAGAGAGCCAGGACAAGACT
CTCTCCCTCCCTGAGCTCGAGCAACAGCAGGAACAGCAGCAGGAGCAGCA
GCAGGAGCAGGTGCAGATGCTGGCCCCCTTGGAGAGC

SEQ ID NO. 5

Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2