

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 028218

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2017.10.31**

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

(21) Номер заявки  
**201391063**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.01.19**

### (54) АПОЛИПОПРОТЕИН А-IV В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА

(31) 61/434,196

(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

(32) 2011.01.19

& 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

(33) US

WO-A2-2009116861

(43) 2013.12.30

WO-A1-9315198

(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)

(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 аполипопротеина А-IV субъекту. Фармацевтическая композиция содержит аполипопротеин 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 глютеиновую 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

```
X1EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQQLNALFQDKLGEVNTYAG  
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ  
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX2LKA  
KIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHNHQUEGLTFQM  
KKNAEELKARISASAEELRQLRPLAEDVRGNLRGNT EGLQKSLAELGGHLDQQVEE  
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK  
EKESQDKX;LSLPELEQQQEQQX4QEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4),
```

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A, V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> 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

```
X1EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQQLNALFQDKLGEVNTYAG  
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ  
QRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX2LKA  
KIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHNHQUEGLTFQM  
KKNAEELKARISASAEELRQLRPLAEDVRGNLRGNT EGLQKSLAELGGHLDQQVEE  
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK  
EKESQDKX;LSLPELEQQQEQQX4QEQQQEQQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4),
```

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A, V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> 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 А-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

```
XIEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAECQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX2LKA
KIDQNVEELKGRRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHNQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQLRPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKX;LSLPELEQQQEQQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4)
```

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A, V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> 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 А-IV представляет собой

```
GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAECQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKA
KIDQNVEELKGRRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHNQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQLRPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKTSLPELEQQQEQQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 3).
```

При этом аполипопротеин А-IV может быть гликозилированным или негликозилированным. Еще в одном другом конкретном варианте осуществления изобретения аполипопротеин А-IV вводят системно. Системное введение аполипопротеина А-IV может быть выбрано из группы, состоящей из перорального, под кожного, внутривенного, внутримышечного и внутрибрюшинного введения. В одном конкретном варианте осуществления аполипопротеин А-IV вводят в дозе от 1 до 10 мкг/г. В другом конкретном варианте осуществления аполипопротеин А-IV вводят в дозе от 0.25 до 2 мкг/г. В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения аполипопротеин А-IV вводят в дозе 1 мкг/г. Аполипопротеин А-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 А-IV, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, где аминокислотная последовательность аполипопротеина А-IV представляет собой

```
XIEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ
QRLEPYADQLRTQVNTQAECQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADX2LKA
KIDQNVEELKGRRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHNQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQLRPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKX3SLPELEQQQEQQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 4),
```

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A, V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> 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 А-IV может представлять собой

```
GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNLREI Q
QRLEPYADQLRTQVNTQAECQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKA
KIDQNVEELKGRRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHNQLEGLTFQM
KKNAEELKARISASAEELRQLRPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK
EKESQDKTSLPELEQQQEQQEQVQMLAPLES (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

```
GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTYAG  
DLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKEELERARLLPHANEVSQKIGDNLRELQ  
QRLEPYADQLRTQVNTQAELRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPHADELKA  
KIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHNQLEGTFQM  
KKNAEEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLRGNTTEGLQKSLAELGGHLDQQVEE  
FRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFK  
EKESQDKTLSLPELEQQQEQQEQQQEQVQMLAPLES (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 аполипоротеин 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 мышах и мышах 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 мышиного 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 мышиного 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 мышиного аполипопротеина A-IV или физиологического раствора в течение интраперитонеального теста толерантности к глюкозе;

на фиг. 14 представлена гистограмма, показывающая влияние 10 мкг/г человеческого апоА-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 мышиного 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" апоА-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. апоА-IV или биологически активный аналог вводят один раз в день. Кроме того, апоА-IV или его биологически активный аналог вводят приблизительно 2 раза в день. В еще одном альтернативном варианте, апоА-IV или его биологически активный аналог вводят более чем два раза в день, например три раза в день. В еще одном альтернативном варианте, апоА-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 Т2ДМ, 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 Т2ДМ, 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 Т2ДМ, 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 Т2ДМ 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 апоA-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 мышиная 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 "апоА-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 С-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 "апоА-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 мышного 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 неприродного происхождения с C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алифатическими или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> гидроксилзамещенными алифатическими боковыми цепями (неразветвленные или с одной разветвленной цепью);

группа II: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота и аминокислоты неприродного происхождения с C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алифатическими боковыми цепями, замещенными карбоновой кислотой (неразветвленные или одной точкой разветвления);

группа III: лизин, орнитин, аргинин и аминокислоты неприродного происхождения с C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алифатическими боковыми цепями, замещенными амином или гуанидином (неразветвленные или одной точкой разветвления);

группа IV: глутамин, аспарагин и аминокислоты неприродного происхождения с C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 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 мышевого 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, описанных 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, продевающих веществ, связывающих веществ, супендирующих 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 апирогенную 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, супензий и сиропа. Форма и путь введения фармацевтической композиции не ограничены и могут быть соответственно выбраны. Например, таблетки, капсулы, гранулы, пилюли, сиропы, растворы, эмульсии и супензии 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, внутрикожно, 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, приготавливают согласно известным методикам с использованием наполнителей, таких как сахароза, лактоза, глюкоза, крахмал, маннитол и подобное; связывающих веществ, таких как сироп, аравийская камедь, сорбит, трагакант, метилцеллюлоза, поливинипирролидон 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; сурфактентов, 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-гидроксибензойной 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, нуждающимся 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 ингибитирует 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 мышах, 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<sup>-/-</sup> 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 апоA-IV нокаутных мышей.**

**Описание опыта.**

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

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

**Экспериментальные результаты.**

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

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

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

**Описание опыта.**

Для того чтобы оценить специфичность апоA-IV, авторы изобретения вводили аполипопротеин AI (далее "апоА-I") апоA-IV КО мышам. АпоA-1 представляет собой белок, вырабатываемый маленькими эпителиальными клетками кишечника, которые также производят апоA-IV. апоA-1 разделяет многие функции апоA-IV. апоA-IV КО мышам вводили интраперитонеально апоA-1 в дозе 1 мкг/г массы. апоA-IV КО мышам также вводили интраперитонеально физиологический раствор, который служил в качестве контроля. После введения апоA-1 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 апоA-1 или физиологического раствора.

**Экспериментальные результаты.**

Как показано на фиг. 5, введение апоA-1 апоA-IV КО мышам не восстанавливает или улучшает толерантность к глюкозе.

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

**Описание опыта.**

Для того чтобы оценить механизм, с помощью которого апоA-IV улучшает толерантность к глюкозе у апоA-IV КО мышей, авторы изобретения измеряли секрецию инсулина, индуцированную глюкозой, у апоA-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 апоA-IV КО мышам вводили интраперитонеально мышиный апоA-IV в дозе приблизительно 1 мкг/г массы за 2 ч до проведения тестов на толерантность к глюкозе. апоA-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 апоA-IV КО мышей, которым вводили физиологический раствор. Кроме того, как показано на фиг. 6, фаза I секреции инсулина была восстановлена у апоA-IV КО мышей, когда вводили интраперитонеально апоA-IV за 2 ч до проведения тестов на толерантность к глюкозе.

**Пример 5. Эффективность апоA-IV у апоA-IV нокаутных мышах и мышах 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. апоA-IV КО и WT мышей помещали в отдельные клетки с подстилкой из сердцевины кукурузных початков в температуро- (приблизительно  $22\pm1^{\circ}\text{C}$ ) 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, апоA-IV КО мышей и WT мышей не кормили в течение 5 ч. В тестах на толерантность к глюкозе апоA-IV КО мышам и WT мышам вводили интраперитонеально глюкозу в дозе приблизительно 2 мг/г массы тела.

#### Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 7, апоA-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 апоA-IV КО мышей в течение 2 ч после введения глюкозы.

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

#### Описание опыта.

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

#### Экспериментальные результаты.

Как показано на фиг. 8, введение апоA-IV у апоA-IV КО мышей значительно улучшает толерантность к глюкозе. В частности, фиг. 8 показывает, что уровни глюкозы в плазме у апоA-IV КО мышей, которым вводили апоA-IV, были ниже, чем уровни глюкозы в плазме у апоA-IV КО мышей, которым вводили физиологический раствор. Хотя данные не включены в настоящую заявку, было также обнаружено, что введение апоA-IV WT мышам, питающимся 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 апоA-IV является эффективным в обеспечении толерантности к глюкозе у животных с T2DM, гетерозиготные KK 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<sup>y</sup> мутацией, которая кодирует агути-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 четырнадцати недель кормления диетическим кормом.

В четырнадцать недель Cg-A/J мышам вводили либо мышний апоA-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, апоA-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 апоA-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 апоA-IV является эффективным в снижении глюкозы в плазме в Cg-A/J мышах.

**Пример 8. Уровень сывороточного амилоидного Р-компоненты у апоA-IV КО, апоA-I КО и WT мышей.**

#### Описание опыта.

Ряд исследований проводили в связи с определением уровня сывороточного амилоидного Р-компонента (далее "SAP") у апоA-IV КО, апоA-I КО и WT мышей на антерогенной диете. апоA-IV КО, апоA-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 апоA-IV КО, апоA-I КО и WT мышей определяли в апоA-IV КО, апоA-I КО и WT мышах 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 (мыши с соответствующими номерами 1, 8 и 10) увеличился относительно уровня SAP у апоA-IКО мышей (мыши с соответствующими номерами 28, 29 и 30) и WT мышей (мыши 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 используется 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 вышеупомянутым 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, подвергающимся 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 мышевиного апоA-IV у самок мышей дикого типа, подвергающихся исследованию на толерантность к глюкозе.

#### Описание опыта.

Исследования осуществляли для определения влияния введения мышевиного 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 мышевинный 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, мышевинный 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, Axon cells. Островки культивировали в RPMI 1640, содержащей 10% FSB и 11 mM глюкозу, при 37°C в увлажненной атмосфере из 95 и 5% CO<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Na-HCO<sub>3</sub>, 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 отсутствие 10 мкг/мл человеческого A-IV и далее инкубировали с 20 mM глюкозы в течение дополнительного часа в присутствии или отсутствие 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 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 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 отсутствие 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 мкМ диазоксида, 10 мкг/мл hA-IV показывал значительное стимулирующее влияние на секрецию инсулина.

Пример 11. Получение негликозилированного апоA-IV.

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

## Перечень последовательностей

<110> Юниверсити оф Цинциннати  
 ТСО, Патрик  
 Дэвидсон, Шон  
 ВУДС, Стивен  
 ВАН , ФЭЙ  
 <120> АПОЛИПОПРОТЕИН А-IV в качестве противодиабетического пептида  
 <130> 120946-00120  
 <140> PCT/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 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 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

Val His Asn Lys Leu Val Pro Phe Val Val Gln Leu Ser Gly His Leu  
 50 55 60  
 Ala Gln Glu Thr Glu Arg Val Lys Glu Glu Ile Lys Lys Glu Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Leu Arg Asp Arg Lys Thr Gln Thr Phe Gly Glu Asn Met Gln Lys  
 85 90 95  
 Leu Gln Glu His Leu Lys Pro Tyr Ala Val Asp Leu Gln Asp Gln Ile  
 100 105 110  
 Asn Thr Gln Thr Gln Glu Met Lys Leu Gln Leu Thr Pro Tyr Ile Gln  
 115 120 125  
 Arg Met Gln Thr Thr Ile Lys Glu Asn Val Asp Asn Leu His Thr Ser  
 130 135 140  
 Met Met Pro Leu Ala Thr Asn Leu Lys Asp Lys Phe Asn Arg Asn Met  
 145 150 155 160  
 Glu Glu Leu Lys Gly His Leu Thr Pro Arg Ala Asn Glu Leu Lys Ala  
 165 170 175  
 Thr Ile Asp Gln Asn Leu Glu Asp Leu Arg Arg Ser Leu Ala Pro Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Gly Val Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Met Glu Gly Leu Ala  
 195 200 205  
 Phe Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Gln Thr Lys Val Ser Ala  
 210 215 220  
 Lys Ile Asp Gln Leu Gln Lys Asn Leu Ala Pro Leu Val Glu Asp Val  
 225 230 235 240  
 Gln Ser Lys Val Lys Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser Leu Glu  
 245 250 255  
 Asp Leu Asn Arg Gln Leu Glu Gln Val Glu Glu Phe Arg Arg Thr  
 260 265 270  
 Val Glu Pro Met Gly Glu Met Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln Gln Leu  
 275 280 285  
 Glu Gln Phe Arg Gln Gln Leu Gly Pro Asn Ser Gly Glu Val Glu Ser  
 290 295 300  
 His Leu Ser Phe Leu Glu Lys Ser Leu Arg Glu Lys Val Asn Ser Phe  
 305 310 315 320  
 Met Ser Thr Leu Glu Lys Lys Gly Ser Pro Asp Gln Pro Gln Ala Leu  
 325 330 335

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 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 Ash 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 Glu Gln Xaa Gln Glu 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  
 gtcagtgtc accagggtgc cacagtgtg tggactact tcagccagct gagcaacaat 60  
 gccaaggagg ccgttgaaca tctccagaaa tctgaactca cccagcaact caatgccctc 120  
 ttccaggaca aacttgaga agtgaacact tacgcagggt acctgcagaa gaagctgg 180  
 ccctttgcca ccgagctgca tgaacgcctg gccaaggact cggagaaact gaaggaggag 240  
 attgggaagg agctggagga gctgaggggcc cggtctgtgc cccatgccaa tgaggtgagc 300  
 cagaagatcg gggacaacct gcgagagctt cagcagcgc tggagcccta cgccggaccag 360  
 ctgcgcaccc aggtcaacac gcaggccgag cagctgcggc gccagctgac cccctacgca 420  
 cagcgcattgg agagagtgtc gcgggagaac gccgacagcc tgcaggccctc gctgaggccc 480  
 cacgccgac agctcaaggc caagatcgac cagaacgtgg aggagctaa gggacgcctt 540  
 acgcctactcg ctgacgaaatt caaatgtcaag attgaccaga ccgtggagga gctgcgcgc 600  
 agcctggctc cctatgtca ggacacgcg gagaagctca accaccagct tgagggcctg 660  
 accttccaga tgaagaagaa cgccgaggag ctcaaggccca ggatctcgcc cagtgccgag 720  
 gagctgcggc agaggctggc gcccttggcc gaggacgtgc gtggcaacct gaggggcaac 780  
 accgaggggc tgcagaagtc actggcagag ctgggtgggc acctggacca gcaggtggag 840  
 gagttccgac gcccgggtgga gccctacggg gaaaacttca acaaagccct ggtgcagcag 900  
 atggAACAGC tcaggcagaa actggggcccc catgcggggg acgtggaaagg ccacctgagc 960  
 ttcctggaga aggacctgag ggacaaggc aactcccttc tcaagcacctt caaggagaaa 1020  
 gagagccagg acaagactct ctccctccct gagctcgagc aacagcagga acagcagcag 1080  
 gagcagcagc aggacgaggt gcagatgtc gccccttgg 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

X<sub>1</sub>EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNNTY  
 AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKEELRARLLPHANEVSQKIGDNL  
 RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH  
 ADX<sub>2</sub>LKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNH  
 QLEGTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE  
 LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDVEGHLSFLEK  
 DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX;LSLPELEQQQEQQX;QEQQQEQQVQMLAPLES  
 (SEQ ID NO. 4)

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A или V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> 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

```
X1EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVVFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADX2LKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNH
QLEGTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEK
DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX3LSLPELEQQQEQQX4QEQQQEQQEQVQMLAPLES
```

(SEQ ID NO. 4)

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A или V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> представляет собой Q или H.

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

```
X1EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVVFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADX2LKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNH
QLEGTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEK
DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX3LSLPELEQQQEQQX4QEQQQEQQEQVQMLAPLES
```

(SEQ ID NO. 4)

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A или V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> 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 А-IV представляет собой

```
GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTY
AGDLQKKLVVFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQ
LEGTFQMKKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
GGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKD
LRDKVNSFFSTFKEKESQDKTLSLPELEQQQEQQQEQQEQVQMLAPLES (SEQ ID
NO. 3).
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

количество аполиопротеина A-IV, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, где аминокислотная последовательность аполипопротеина A-IV представляет собой

```
X1EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNT
AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADX2LAKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLNH
QLEGLTFQMKNAEELKARISASAEEERQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
LGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEK
DLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX3LSLPELEQQQEQQ4EQQQEQVQMLAPLES
```

(SEQ ID NO. 4)

где X<sub>1</sub> представляет собой G, A или V;

X<sub>2</sub> представляет собой E или K;

X<sub>3</sub> представляет собой T или S и

X<sub>4</sub> 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 аполипопротеина A-IV представляет собой

```
GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNT
AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHQ
LEGLTFQMKNAEELKARISASAEEERQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
GGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKD
LRDKVNSFFSTFKEKESQDKTLSLPELEQQQEQQ4EQQQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 3).
```

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

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

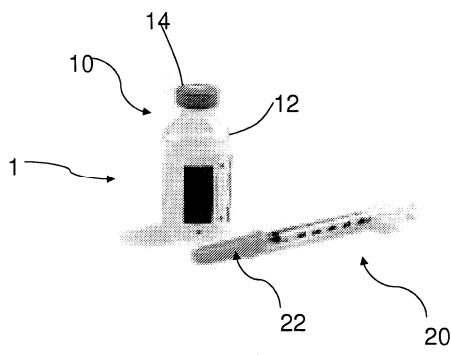
22. Способ лечения сахарного диабета II типа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп.15-21.

23. Противодиабетический полипептид аполипопротеина A-IV, аминокислотная последовательность которого представляет собой

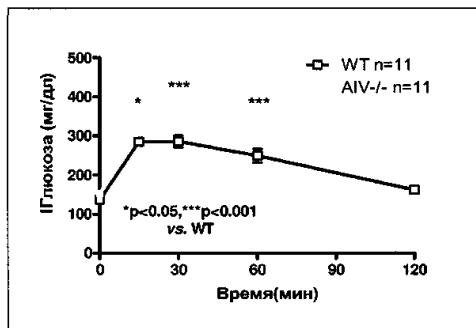
```
GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNT
AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKIGDNL
RELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRQLTPYAQRMERVLRENADSLQASLRPH
ADELKAKIDQNVEELKGRLTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQEKLHQ
LEGLTFQMKNAEELKARISASAEEERQRLAPLAEDVRGNLRGNTEGLQKSLAE
GGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKD
LRDKVNSFFSTFKEKESQDKTLSLPELEQQQEQQ4EQQQEQVQMLAPLES (SEQ ID NO. 3).
```

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

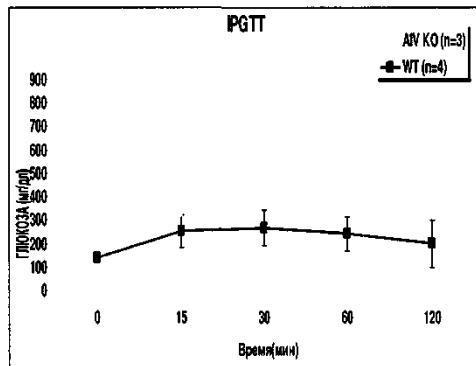
25. Полипептид по п.23, который является негликозилированным.



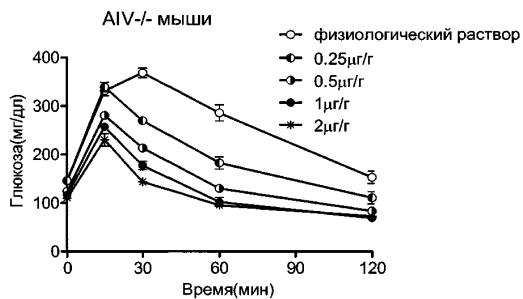
Фиг. 1



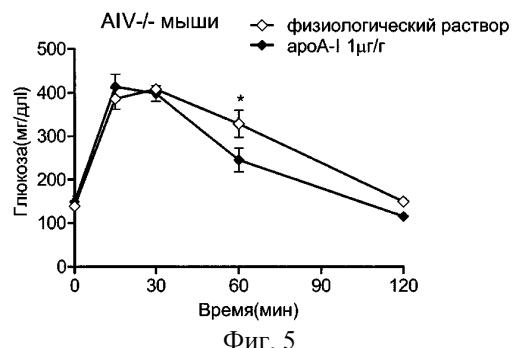
Фиг. 2



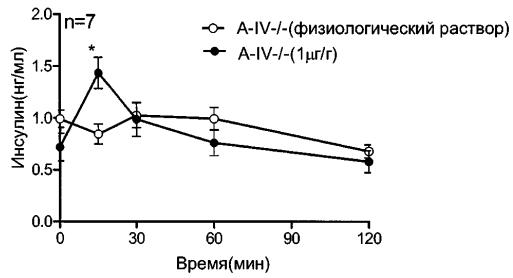
Фиг. 3



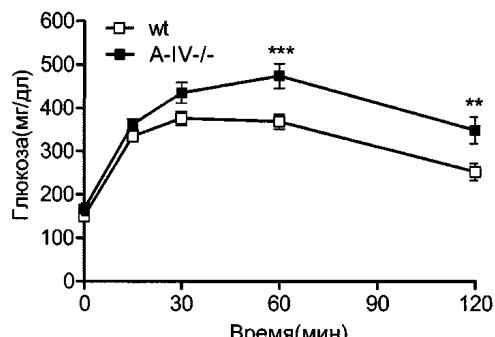
Фиг. 4



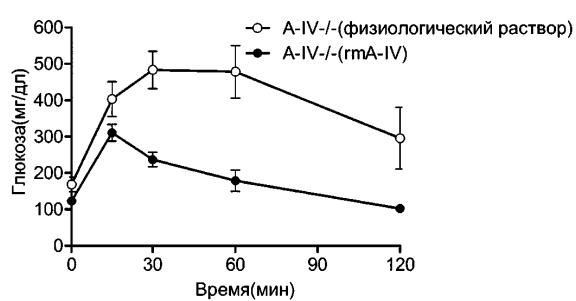
Фиг. 5



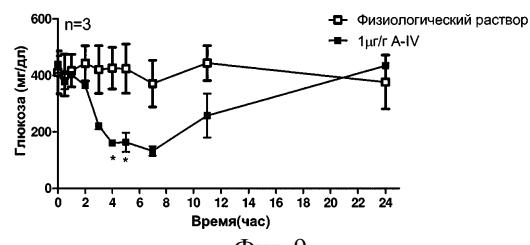
Фиг. 6



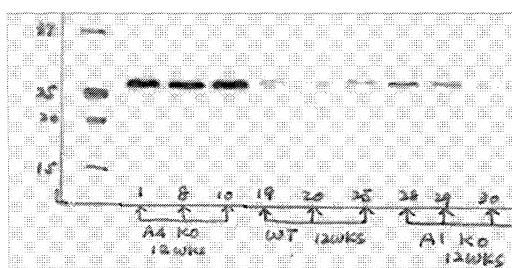
Фиг. 7



Фиг. 8

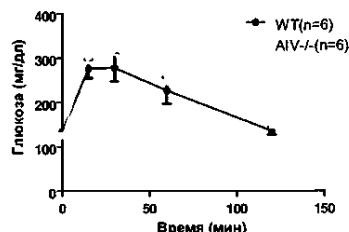


Фиг. 9



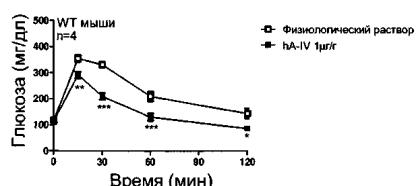
Фиг. 10

## IPGTT у самок WT и AIIV-KO мышей



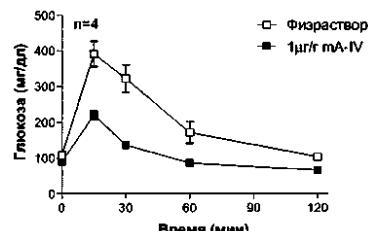
Фиг. 11

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



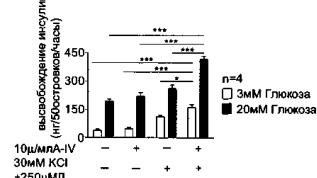
Фиг. 12

## Самки WT мышей



Фиг. 13

## Человеческие островки, обработанные человеческим A-IV



Когда человеческие островки разрушены  
30мM KCl с добавлением 250μM Dz,  
10μg/мл hA-IV показывает значительный  
стимулирующий эффект на секрецию инсулина.

Фиг. 14

EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKLGEVNTY  
 AGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSQKGD  
 NLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAERLRRQLTPYAQRMERVLRENADSLQAS  
 LRPHADELKAKIDQNVEELKGRTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPYAQDTQE  
 KLNHQLEGGLTFQMCKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLRGNT EGL  
 QKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPAGDV  
 EGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTLSLPELEQQEQQQEQV  
 QMLAPLES

SEQ ID NO. 1

Фиг. 15

EVTSDQVANVVWDYFTQLSNNAKEAVEQFQKTDVQQQLST  
 LFASTYADGVHNKLVPFVVQLSGHLAGETERVKEEIKKEL  
 EDLRDRKTQTFGENMQKLQEHLPYAVDLQDQINTQTQE  
 MKLQLTPYIQRMQTTIKENVNDNLHTSMMPLATNLKDFN  
 RNMEELKGHLTPRANELKATIDQNLEDLRRSLAPLTGVQ  
 EKLNHQMEGLAFQMCKNAEELQTKVSAKIDQLQKNLAPL  
 VEDVQSKVKGNTEGLQKSLEDLNRQLEQQVEEFRTVEP  
 MGEMFNKALVQQLEQFRQQLGPNSGEVESHLFLEKSLRE  
 KVNSFMSTLEKKGSPDQPQALPLPEQAQEQAQEQQV  
 PKPLES

SEQ ID NO. 2

Фиг. 16

GEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKL  
 GEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV  
 SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAERLRRQLTPYAQRMERVLRENA  
 DSLQASLRPHADELKAKIDQNVEELKGRTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPY  
 AQDTQEKLNHQLEGGLTFQMCKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLR  
 GNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKL  
 PHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKTLSLPELEQQEQV  
 QQEQVQMLAPLES

SEQ ID NO. 3

Фиг. 17

X<sub>1</sub>EVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTQQLNALFQDKL  
 GEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEV  
 SQKIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAERLRRQLTPYAQRMERVLRENA  
 DSLQASLRPHADX<sub>2</sub>LAKIDQNVEELKGRTPYADEFKVKIDQTVEELRRSLAPY  
 YAQDTQEKLNHQLEGGLTFQMCKNAEELKARISASAEELRQRLAPLAEDVRGNLR  
 RGNTEGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRRRVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKL  
 GPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDKX<sub>3</sub>LSLPELEQQEQX<sub>3</sub>  
 QEQQEQVQMLAPLES

X<sub>1</sub> is G, A, V or absentX<sub>2</sub> is E or KX<sub>3</sub> is T or SX<sub>4</sub> is Q or H

SEQ ID NO. 4

Фиг. 18

GTCAGTGCTGACCAGGTGGCCACAGTGATGTGGGACTACTTCAGCC  
AGCTGAGCAACAATGCCAAGGAGGGCGTGGAACATCTCCAGAAATCTGAA  
CTCACCCAGCAACTCAATGCCCTTCCAGGACAAACTGGAGAAGTGAAC  
ACTTACGCAGGTGACCTGAGAAGAAGCTGGAGAAACTGAAGGAGGAGATTGGGA  
AGGAGCTGGAGGAGCTGAGGGCCCGCTGCTGCCCATGCCACCGAGCT  
GCATGAACGCCCTGGCCAAGGACTCGGAGAACTGAAGGAGGAGATTGGGA  
AGGAGCTGGAGGAGCTGAGGGCCCGCTGCTGCCCATGCCACCGAGCT  
GAGCCAGAAGATCGGGACAACCTGCGAGAGCTTCAGCAGCGCCTGGAG  
CCCTACCGCGCAGCTGCGCACCCAGCTGCAACACGCAGGCCGAGCAGC  
TGCAGCTGAGGGCCTGACCTCCAGATGAAGAACGCCGAGGAGCT  
GGAGAACGCCGACAGCCTGAGGCTCGTGAAGGCCACGCCGACGAG  
CTCAAGGCCAAGATCGACCAAGAAGTGGAGGAGCTCAAGGGACGCCCTAC  
GCCCTACGCTGACGAATTCAAAGTCAGATTGACCAAGACCGTGGAGGAGC  
TGCAGCTGAGGGCCTGACCTCCAGATGAAGAACGCCGAGGAGCT  
CACAGCTTGGAGGAGCTGCCAGTGCAGGAGCTGCCAGAGGCTGGCG  
CCCTTGGCCGAGGAGCTGCCAGTGCAGGAGCTGCCAGAGGCTGGCG  
TGCAGAAGTCAGTGGCAGAGCTGGGTGGCACCTGGACCAGCAGGTGGA  
GGAGTCCCAGCAGCCGGGTGGAGGCCCTACGGGGAAAACCTCAACAAAGCCC  
TGGTGCAGCAGATGGAACAGCTCAGGCAGAAAACCTGGGGCCCCATGCCGG  
GGACGTGAAAGGCCACCTGAGCTTCTGGAGAAGGACCTGAGGGACAAG  
CTCAACTCCTCTTGAGCTGAGCAACAGCAGGAACAGCAGCAGGAGCAGCA  
CTCTCCCTCCCTGAGCTGAGCAACAGCAGGAACAGCAGCAGGAGCAGCA  
GCAGGAGCAGGTGCAGATGCTGGCCCTTGGAGAGC

SEQ ID NO. 5

Фиг. 19

