(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202091533 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.16

(22) Дата подачи заявки
2019.01.17

(51) Int. Cl. ***A61P 1/16*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТА, ГЕПАТИТА И/ИЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕЧЕНИ

(31) **62/618,332**
(32) **2018.01.17**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/013934**
(87) **WO 2019/143767 2019.07.25**

(71) Заявитель:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КОННЕКТИКУТ; ДЖОСЛИН ДИАБЕТС СЕНТР, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Лайнс Майкл А., Цзэн Юй-Хуа, Лайнс Мэттью Д. (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем документе раскрыты применения ингибитора внеклеточного металлотионеина (МТ) человека для лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени, и композиций, содержащих внеклеточный МТ человека.

202091533 A1

202091533 A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТА, ГЕПАТИТА И/ИЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕЧЕНИ

Перекрестная ссылка

Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/618332, поданной 17 января 2018 г., полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Для лечения диабета чаще всего применяют инсулинотерапию. Проводятся исследования по замене островков, повреждаемых при диабете, но если воспалительные процессы, повреждающие островок, вырабатывающий инсулин, не прекращаются, трансплантация островков или репопуляция стволовых клеток островков в поджелудочной железе будет представлять собой кратковременные варианты лечения. Точно так же неудовлетворительными являются существующие способы лечения гепатита и/или воспалительного заболевания печени.

Краткое описание изобретения

В первом аспекте изобретения предложены способы лечения или ограничения развития расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени, включающие введение субъекту, страдающему от указанного расстройства или подверженному риску развития указанного расстройства, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор внеклеточного металлотионеина (MT) человека, для лечения или ограничения развития указанного расстройства. В одном из вариантов осуществления субъект страдает от диабета или подвержен риску развития диабета, и способ предназначен для лечения или ограничения развития диабета. В еще одном варианте осуществления субъект подвержен риску развития диабета 1 типа, и способ предназначен для ограничения развития диабета 1 типа у субъекта; в одном таком варианте осуществления субъект может иметь один или более факторов риска развития диабета 1 типа, включая, не ограничиваясь перечисленным, родителя, брата или сестру с диабетом 1 типа, опухоль поджелудочной железы, панкреатит, аутоантитела к островковым клеткам поджелудочной железы, аутоантитела к инсулину, аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (GADA), инсулинома-ассоциированные (IA-2) аутоантитела, аутоантитела к транспортеру цинка (ZnT8), варианты гена IDDM1, выбранные из группы,

состоящей из DRB1 0401, DRB1 0402, DRB1 0405, DQA 0301, DQB1 0302 и DQB1 0201; полиурию, полидипсию, сухость во рту, полифагию, утомляемость или потерю массы тела.

В еще одном варианте осуществления субъект страдает от диабета 1 типа, и способ предназначен для лечения диабета 1 типа у субъекта; в одном таком варианте осуществления лечение может включать одно или более из снижения частоты необходимости введения инсулина; замедления развития или прогрессирования осложнений диабета 1 типа у субъекта, включая, не ограничиваясь перечисленным, разрушение бета-клеток поджелудочной железы, гипергликемию, гипогликемию, полиурию, полифагию, полидипсию, потерю массы тела, нечеткость зрения, утомляемость, снижение способности к заживлению ран, инфекции мочевыводящих путей, нарушение половой функции, сухость во рту, диабетический кетоацидоз, сердечно-сосудистое заболевание, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, инсульт, почечную недостаточность и язвы стопы; и отсрочки необходимости трансплантации поджелудочной железы или островковых клеток поджелудочной железы.

В еще одном варианте осуществления субъект подвержен риску диабета 2 типа, и способ предназначен для ограничения развития диабета 2 типа у субъекта; в одном таком варианте осуществления субъект может иметь один или более факторов риска развития диабета 2 типа, включая, не ограничиваясь перечисленным, ожирение, курение, малоподвижный образ жизни, родителя, брата или сестру с диабетом 2 типа, предиабет, родителя, брата или сестру с предиабетом, привычки к нездоровому питанию (например: слишком много жиров, недостаточно клетчатки, слишком много простых углеводов и т. д.), возраст 50 лет и старше, повышенное артериальное давление, высокий уровень холестерина, дефицит тестостерона, однонуклеотидный полиморфизм гена металлотионеина 1 A (MT1A) в локусе rs8052394 (изменение G) и гестационный диабет в анамнезе.

В еще одном варианте осуществления субъект страдает от диабета 2 типа, и способ предназначен для лечения диабета 2 типа у субъекта; в одном таком варианте осуществления лечение может включать ограничение одного или более осложнений диабета 2 типа, включая, не ограничиваясь перечисленным, гипергликемию, гипогликемию, инсулинорезистентность, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, протеинурию, нарушение гломерулярного клиренса, связанные с диабетом нарушения кровообращения, почечную недостаточность,

сердечно-сосудистое заболевание, полиурию, полидипсию, потерю массы тела, инсульт и снижение частоты потребности в инсулине или другой терапии.

В дополнительном варианте осуществления субъект страдает от предиабета, и способ предназначен для лечения предиабета у субъекта; в одном таком варианте осуществления лечение может включать ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений предиабета, включая, не ограничиваясь перечисленным, диабет 2 типа, гипергликемию, инсулинорезистентность и/или сердечно-сосудистое заболевание.

В одном из вариантов осуществления субъект страдает от нарушения толерантности к глюкозе, и способ предназначен для лечения нарушения толерантности к глюкозе у субъекта; в одном таком варианте осуществления лечение может включать ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений нарушения толерантности к глюкозе, включая, не ограничиваясь перечисленным, диабет 2 типа, гипергликемию, инсулинорезистентность и/или сердечно-сосудистое заболевание.

В дополнительном варианте осуществления субъект страдает от гепатита, и способ предназначен для лечения гепатита у субъекта; в одном таком варианте осуществления лечение может включать ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений гепатита, включая, не ограничиваясь перечисленным, желтое окрашивание кожи и/или склер глаз, снижение аппетита, рвоту, утомляемость, боль в животе, диарею, острую печеночную недостаточность, рубцевание печени, печеночную недостаточность и рак печени.

В еще одном варианте осуществления субъект страдает от воспалительного заболевания печени, и способ предназначен для лечения воспалительного заболевания печени у субъекта. В одном таком варианте осуществления воспалительное заболевание печени может быть выбрано из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и/или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). В еще одном таком варианте осуществления лечение может включать ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений воспалительного заболевания печени, включая, не ограничиваясь перечисленным, утомляемость, недомогание, фиброз печени, рак печени и/или цирроз печени.

В одном из вариантов осуществления ингибитор внеклеточного МТ человека может содержать антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент и/или аптамер, специфически связывающиеся с внеклеточным МТ человека. В одном таком варианте осуществления ингибитор внеклеточного МТ человека содержит антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент, включая, не ограничиваясь перечисленным,

моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и гуманизированное антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент.

В еще одном варианте осуществления ингибитор внеклеточного МТ человека связан с фрагментом, нацеленным на клетки поджелудочной железы или печени. В одном таком варианте осуществления фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы, может содержать один или более пептидов или других фрагментов, избирательно связывающих β-клетки поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2), пептида YY (PYY), нейропептида Y (NPY), пептида поджелудочной железы (PPY) и эксендин-4. В еще одном варианте осуществления фрагмент, нацеленный на клетки печени, может включать, не ограничиваясь перечисленным, циркумспорозоитный белок (CSP), область I CSP, область I-плюс CSP, лактозаминированный сывороточный альбумин человека, гликозилированный липопротеин и/или арабиногалактан.

В одном из вариантов осуществления субъект представляет собой млекопитающее, включая, не ограничиваясь перечисленным, человека.

В еще одном аспекте изобретения предложены композиции, содержащие:

(a) ингибитор внеклеточного металлотионеина (МТ) человека; и

(b) фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы или печени, связанный с ингибитором внеклеточного МТ человека.

В одном из вариантов осуществления ингибитор содержит антитело к металлотионеину или его фрагмент, специфически связывающийся с металлотионеином (МТ) человека, включая, но не ограничиваясь перечисленным, моноклональное антитело и/или гуманизированное антитело, или их антигенсвязывающие фрагменты. В еще одном варианте осуществления фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы, такой как фрагмент, выбранный из группы, состоящей из глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2), пептида YY (PYY), нейропептида Y (NPY), пептида поджелудочной железы (PPY) и эксендина-4. В еще одном варианте осуществления фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки печени, который может включать, не ограничиваясь перечисленным, циркумспорозоитный белок (CSP), область I CSP, область I-плюс CSP, лактозаминированный сывороточный альбумин человека, гликозилированный липопротеин и/или арабиногалактан.

В одном из вариантов осуществления композиция содержит рекомбинантный полипептид. В других аспектах изобретения предложены рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный полипептид, рекомбинантные векторы

экспрессии, содержащие рекомбинантные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие рекомбинантные векторы экспрессии, и фармацевтические композиции, содержащие (a) композиции, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии или рекомбинантные клетки-хозяева согласно изобретению; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение композиций, рекомбинантных нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих рекомбинантные векторы экспрессии, и фармацевтических композиций, содержащих композиции, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, рекомбинантные клетки-хозяева согласно изобретению, или фармацевтических композиций согласно любому из вариантов осуществления или комбинации вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, для лечения или ограничения развития расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени.

В еще одном варианте осуществления способов согласно изобретению ингибитор внеклеточного MT человека содержит композиции, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие рекомбинантные векторы экспрессии, и фармацевтические композиции, содержащие композиции, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, рекомбинантные клетки-хозяева согласно настоящему изобретению, или фармацевтические композиции согласно любому из вариантов осуществления или комбинации вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе.

Описание чертежей

Фигура 1. График, демонстрирующий результаты глюкозотолерантного теста у мышей, получивших внутрибрюшинную инъекцию глюкозы после курса лечения MOPC21 или UC1MT.

Фигура 2. График, демонстрирующий изменение результатов глюкозотолерантного теста, нормированное к исходному показателю для каждого животного в группе, представленной на фигуре 1.

Фигура 3. График, демонстрирующий влияние MOPC21 или UC1MT на уровни экспрессии РНК в эпидидимальной белой жировой ткани с помощью исследований методом кПЦР. Лечение с помощью UC1MT оказало влияние на экспрессию некоторых генов в эпидидимальной белой жировой ткани (в особенности, гамма-коактиватора 1-

альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PGC-1a), транскрипционного коактиватора, регулирующего энергетический обмен, и альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PPAR-r)).

Фигура 4. Графики, демонстрирующие влияние лечения антителами на массу жировой ткани: **(A)** Масса ткани в процентах от массы тела**; (B)** Масса ткани в граммах. Следует отметить изменения в эпидидимальной белой жировой ткани (eWAT). (BAT = бурая жировая ткань; sWAT = подкожная белая жировая ткань).

Фигура 5. График, демонстрирующий влияние MOPC21 или UC1MT на уровни экспрессии РНК в печени с помощью исследований методом кПЦР. Наблюдается значительное увеличение экспрессии гена противовоспалительного IL-10, которое коррелирует с лечением с помощью UC1MT у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, по сравнению с мышами на HFD, получавшими лечение изотипичесаки сходным контрольным антителом MOPC21.

Фигура 6. График, демонстрирующий влияние MOPC21 или UC1MT на триглицериды печени с использованием набора Thermo Fisher Trigylcerides (колориметрический анализ). Показаны средние и стандартная ошибка N = 8 MOPC, 10 UC1MT для самцов мышей, получавших HFD в течение 16 недель. * p = 0,0453 по 2-стороннему критерию Стьюдента.

Фигура 7. График, демонстрирующий влияние ежедневной внутрибрюшинной инъекции MOPC21 или UC1MT (100 мкл на мышь в течение двух недель) на уровни глюкозы в крови у мышей NOD в течение 30-недельного периода. Лечение с помощью UC1MT предотвращало развитие Д1Т у мышей NOD.

Фигура 8. Графики, демонстрирующие влияние внутрибрюшинной инъекции UC1MT или MOPC21, 100 мкл на мышь (два раза в неделю), на уровень глюкозы в крови у мышей в течение 3-недельного (A) и 6-недельного (B) периода. Лечение с помощью UC1MT предотвращало развитие Д1Т у мышей NOD.

Фигура 9. График, демонстрирующий влияние MOPC21 или UC1MT на инфильтрацию воспалительными клетками островков Лангерганса (инсулинит).

Подробное описание изобретения

В контексте настоящей заявки формы единственного числа включают также и формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. В контексте настоящей заявки «и» используется взаимозаменяемо с «или», если явно не указано иное.

Все варианты осуществления любого аспекта изобретения могут быть использованы в комбинации, если из контекста явно не следует иное.

Если из контекста явно не следует иное, во всем описании и формуле изобретения слова «содержит», «содержащий» и тому подобное следует толковать во включительном смысле, а не в исключительном или исчерпывающем смысле; то есть, как означающие «включающий, не ограничиваясь перечисленным». Слова в единственном или множественном числе также включают множественное и единственное число, соответственно. Кроме того, слова «в настоящей заявке», «выше» и «ниже» и слова аналогичного значения в контексте настоящей заявки относятся к данной заявке в целом, а не к каким-либо конкретным частям заявки. Композиции и способы их применения могут «содержать», «по существу состоять из» или «состоять из» любых ингредиентов или стадий, раскрытых в описании.

Описание вариантов осуществления изобретения не следует считать исчерпывающим или ограничивающим изобретение конкретной описанной формой. В то время как конкретные варианты осуществления и примеры изобретения описаны в настоящем документе в целях иллюстрации, возможность различных эквивалентных модификаций в объеме изобретения будет очевидна специалистам в данной области техники.

В одном из аспектов изобретения предложены способы лечения или ограничения развития расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени, включающие введение субъекту, страдающему от указанного расстройства или подверженному риску развития указанного расстройства, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор внеклеточного человеческого металлотионеина (МТ), для лечения или ограничения развития указанного расстройства.

Как раскрыто в приведенных ниже примерах, ингибиторы внеклеточного МТ человека неожиданно могут найти применение для лечения или ограничения развития диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени.

В контексте настоящего документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству композиции, эффективному для лечения и/или ограничения соответствующего расстройства.

В контексте настоящего документа термин «металлотионеин человека» означает любую из 18 изоформ и субизоформ металлотионеина, которые были идентифицированы у людей и отнесены к группам МТ1-МТ4. В то время как МТ3 и МТ4 экспрессируются селективно, МТ1 и МТ2 высоко индуцибельны во многих типах клеток и могут высвобождаться из клеток (Lynes et al. 2006; Laukens et al. 2009). Ингибиторы согласно

настоящему изобретению специфически нацелены или связываются с высвобожденными металлотионеинами. Примеры таких изоформ включают, не ограничиваясь перечисленным:

MT1-A человека:
MDPNCSCATG GSCTCTGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPMS CAKCAQGCICKGASEKCSCC A (SEQ ID NO: 1)

MT1-B человека
MDPNCSCTTG GSCACAGSCK CKECKCTSCK KCCCSCCPVG CAKCAQGCVCKGSSEKCRCC A (SEQ ID NO: 2)

MT1-E человека
MDPNCSCATG GSCTCAGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPVG CAKCAQGCVCKGASEKCSCC A (SEQ ID NO: 3)

MT1_F человека
MDPNCSCAAG VSCTCAGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPVG CSKCAQGCVCKGASEKCSCC D (SEQ ID NO: 4)

MT1-G человека:
MDPNCSCAAA GVSCTCASSC KCKECKCTSC KKSCCSCCPV GCAKCAQGCICKGASEKCSC CA (SEQ ID NO: 5)

MT2 человека:
MDPNCSCAAG DSCTCAGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPVG CAKCAQGCICKGASDKCSCC A (SEQ ID NO: 6)

MT3 человека:
MDPETCPCPS GGSCTCADSC KCEGCKCTSC KKSCCSCCPA ECEKCAKDCVCKGGEAAEAE AEKCSCCQ (SEQ ID NO: 7)

MT-4 человека
MDPRECVCMS GGICMCGDNC KCTTCNCKTY WKSCCPCCPP GCAKCARGCICKGGSDKCSC CP (SEQ ID NO: 8)

В одном из вариантов осуществления ингибиторы согласно настоящему изобретению специфически нацелены или связываются с высвобожденными MT1 и/или MT2.

Термины «специфическое» или «селективное» связывание с металлотионеином относятся к реакции связывания, позволяющей определять присутствие металлотионеина в гетерогенной популяции белков и других биологических веществ. Таким образом, при специализированном иммуноанализе или других условиях указанные антитела или аптамеры согласно настоящему изобретению связываются с металлотионеином с силой, по меньшей мере в два раза превышающей фон, и по существу не связываются в значительном количестве с белками, отличными от металлотионеинов, присутствующими в образце. Таким образом, специфическое связывание с антителом или аптамером в таких условиях может включать использование ингибитора, выбранного из группы, состоящей из антитела или аптамера, выбранного исходя из его специфичности к металлотионеину.

В контексте настоящего документа термин «антитело» включает молекулу иммуноглобулина, иммунологически реакционноспособную по отношению к MT человека (предпочтительно селективную к MT человека или селективную к одной или более изоформам MT человека) или его фрагментам, и включает моноклональные антитела. Существуют различные изотипы антител, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и другие Ig, например, изотипы IgM, IgA, IgE. Данный термин также включает генетически сконструированные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышиные антитела) и гетероконъюгаты антител (например, биспецифические антитела), полностью гуманизированные антитела и антитела человека. В контексте настоящей заявки термин «антитело» включает фрагменты с антигенсвязывающей способностью (например, Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv и rIgG. См. также Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). См. также, например, Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York (1998). Данный термин также относится к рекомбинантным одноцепочечным Fv-фрагментам (scFv). Термин «антитело» также включает бивалентные или биспецифические молекулы, диатела, триатела и тетратела. Бивалентные и биспецифические молекулы описаны, например, в Kostelny *et al.*.(1992) *J Immunol* 148:1547, Pack and Pluckthun (1992) *Biochemistry* 31:1579, Hollinger *et al.*, 1993, цитируемый выше, Gruber *et al.* (1994) *J Immunol* :5368, Zhu *et al.* (1997) *Protein Sci* 6:781, Hu *et al.* (1996) *Cancer Res.* 56:3055, Adams *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:4026 и McCartney, *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8:301. Антитела могут включать гетеробифункциональные антитела, например, способные стабилизировать MT в определенном положении посредством связывания другого плеча антитела с тканеспецифической детерминантой, в

то время как анти-MT плечо блокирует функцию MT. В одном из вариантов осуществления антитело включает моноклональное антитело. В примерах продемонстрировано осуществление способов согласно изобретению с использованием иллюстративного моноклонального антитела UC1MT, описанного в US 2003/0007973 и коммерчески доступного от Abcam Inc, Кембридж, Массачусетс. Клон UC1MT также был описан Lynes et al. (Toxicology 1993 (85): 161-177).

В одном из вариантов осуществления антитело, используемое в способах, описанных в настоящем документе, представляет собой гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела относятся к формам антител нечеловеческого происхождения (например, мышиных), которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Преимущественно гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR отличного от человека вида (антитело-донор), такого как мышь, крыса или кролик, имеющей желаемую специфичность, аффинность и антигенсвязывающую способность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, не содержащиеся ни в антителе-реципиенте, ни в импортированных CDR или каркасных последовательностях, но включенные для дополнительного улучшения и оптимизации характеристик антитела. В целом, гуманизированное антитело может содержать по существу все из по меньшей мере одного, и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям CDR иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, а все или по существу все FR-области соответствуют FR-областям консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело оптимально также содержит по меньшей мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененных относительно исходного антитела, которые также называются одной или более CDR, «производными из» одной или более CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела могут также включать созревание аффинности.

В контексте настоящего документа термин «лечить» или «лечение» означает достижение одного или более из следующего у индивидуума, страдающего от одного или более из перечисленных расстройств: (a) снижение тяжести расстройства; (b) ограничение или предотвращение развития симптомов, характерных для расстройства (расстройств), подлежащего лечению; (c) ингибирование ухудшения симптомов, характерных для расстройства (расстройств), подлежащего лечению; (d) ограничение или предотвращение рецидива расстройства (расстройств) у пациентов, ранее страдавших от расстройства (расстройств); и/или (e) ограничение или предотвращение рецидива симптомов у пациентов, ранее имевших симптомы расстройства (расстройств). Любое такое «лечение» приносит большую пользу субъекту, страдающему от одного из перечисленных расстройств.

В контексте настоящего документе «ограничивать» или «ограничивать развитие» означает достижение одного или более из следующего у индивидуума, подверженного риску развития одного или более из перечисленных расстройств: (a) замедление прогрессирования до расстройства и/или (b) ограничение или предотвращение развития симптомов, характерных для прогрессирования до расстройства. Любое такое «ограничение развития» приносит большую пользу субъекту, подверженному риску развития одного из перечисленных расстройств.

Такое лечение или ограничение развития может включать применение ингибитора внеклеточного MT в качестве единственного терапевтического средства или может включать его применение для дополнения других методов лечения или повышения их эффективности, в зависимости от решения лечащего медицинского персонала.

В одном из вариантов осуществления субъект страдает от диабета или подвержен риску развития диабета, и способ предназначен для лечения или ограничения развития диабета.

В одном таком варианте осуществления субъект подвержен риску развития диабета 1 типа, и способ предназначен для ограничения развития диабета 1 типа у субъекта. Как показано в приведенных ниже примерах, ингибиторы MT1 человека предотвращали развитие диабета 1 типа в модели на мышах NOD. Таким образом, способы согласно этому варианту осуществления могут быть использованы для ограничения развития диабета 1 типа (Д1Т) у субъектов, подверженных риску развития Д1Т. Ограничение развития Д1Т может включать, не ограничиваясь перечисленным, замедление прогрессирования до Д1Т и/или замедление развития симптомов, характерных для Д1Т. В этом варианте осуществления субъект, подверженный риску развития Д1Т, имеет один или более факторов риска развития Д1Т, исходя из которых лечащий медицинский

персонал считает лечение подходящим. Такие факторы риска развития Д1Т включают, не ограничиваясь перечисленным: родителя, брата или сестру с диабетом 1 типа, опухоль поджелудочной железы, панкреатит, аутоантитела к островковым клеткам поджелудочной железы, аутоантитела к инсулину, аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (GADA), инсулинома-ассоциированные (IA-2) аутоантитела, аутоантитела к транспортеру цинка (ZnT8) и/или варианты гена IDDM1, выбранные из группы, состоящей из DRB1 0401, DRB1 0402, DRB1 0405, DQA 0301, DQB1 0302 и DQB1 0201. В качестве альтернативы или комбинации, субъект может демонстрировать один или более симптомов Д1Т (но у него может быть еще не диагностирован Д1Т); такие симптомы могут включать, не ограничиваясь перечисленным, полиурию (увеличение мочеиспускания), полидипсию (усиленную жажду), сухость во рту, полифагию (усиленный голод), утомляемость и потерю массы тела. Как будет ясно специалистам в данной области техники, любое ограничение развития Д1Т или его симптомов приносит большую пользу субъекту, подверженному риску его развития.

Ген инсулинозависимого (1 типа) сахарного диабета 1 (IDDM1) расположен в области ГКГС II класса на 6 хромосоме. Определенные варианты этого гена увеличивают риск снижения гистосовместимости, характерной для диабета 1 типа. Такие варианты включают DRB1 0401, DRB1 0402, DRB1 0405, DQA 0301, DQB1 0302 и DQB1 0201. Аналогичным образом, появление связанных с диабетом аутоантител, таких как аутоантитела к островковым клеткам поджелудочной железы, аутоантитела к инсулину, аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (GADA), инсулинома-ассоциированные (IA-2) аутоантитела, аутоантитела к транспортеру цинка (ZnT8), часто предшествуют гипергликемическому диабету 1 типа до возникновения гипергликемии. Риск Д1Т возрастает с увеличением количества типов антител, а временной интервал от появления аутоантител до клинически диагностируемого Д1Т может составлять несколько месяцев у младенцев и детей младшего возраста, но у некоторых людей он может занять годы. Такие аутоантитела могут быть обнаружены, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа или анализа связывания.

В еще одном варианте осуществления субъект страдает от диабета 1 типа, и способ предназначен для лечения диабета 1 типа у субъекта. В этом варианте осуществления у субъекта уже был диагностирован Д1Т, и способы могут быть использованы для лечения Д1Т. Д1Т включает в себя аутоиммунное разрушение бета-клеток поджелудочной железы, практически полное или полное отсутствие выработки инсулина и гипергликемию. Таким образом, лечение Д1Т включает введение субъекту инсулина. Субъекты с Д1Т могут иметь симптомы или осложнения, включая, не ограничиваясь перечисленным,

гипогликемию, полиурию, полифагию, полидипсию, потерю массы тела, нечеткость зрения, утомляемость, снижение способности к заживлению ран, инфекции мочевыводящих путей, нарушение половой функции, сухость во рту, диабетический кетоацидоз, сердечно-сосудистое заболевание, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, инсульт, почечную недостаточность и язвы стопы. В некоторых случаях субъекту, страдающему от Д1Т, может потребоваться трансплантация поджелудочной железы или островков поджелудочной железы. Таким образом, в различных вариантах осуществления лечение может включать одно или более из снижения частоты необходимости введения инсулина; замедления развития или прогрессирования осложнений диабета 1 типа у субъекта, включая, не ограничиваясь перечисленным, разрушение бета-клеток поджелудочной железы, гипергликемию, гипогликемию, полиурию, полифагию, полидипсию, потерю массы тела, нечеткость зрения, утомляемость, снижение способности к заживлению ран, инфекции мочевыводящих путей, нарушение половой функции, сухость во рту, диабетический кетоацидоз, сердечно-сосудистое заболевание, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, инсульт, почечную недостаточность и язвы стопы; и отсрочки необходимости трансплантации поджелудочной железы или островковых клеток поджелудочной железы. В одном из вариантов осуществления лечение может включать снижение уровней глюкозы в крови (мг/дл) на 10%, 15%, 20% или более, например, в течение 20-120 минут после введения ингибитора.

В еще одном варианте осуществления субъект подвержен риску развития диабета 2 типа, и способ предназначен для ограничения развития диабета 2 типа (Д2Т) у субъекта. Д2Т представляет собой нарушение обмена веществ, характеризующееся гипергликемией, инсулинорезистентностью и относительным недостатком инсулина. Симптомы и/или осложнения включают, не ограничиваясь перечисленным, гипогликемию, инсулинорезистентность, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, протеинурию, нарушение гломерулярного клиренса, связанные с диабетом нарушения кровообращения, почечную недостаточность, сердечно-сосудистое заболевание, полиурию, полидипсию, потерю массы тела и инсульт. В одном из вариантов осуществления ограничение развития диабета 2 типа может включать снижение уровней глюкозы в крови (мг/дл) на 10%, 15%, 20% или более, например, в течение 20-120 минут после введения ингибитора.

Факторы риска развития диабета 2 типа включают, не ограничиваясь перечисленным, ожирение, курение, малоподвижный образ жизни, родителя, брата или

сестру с диабетом 2 типа, предиабет, родителя, брата или сестру с предиабетом, привычки к нездоровому питанию (например: слишком много жира, недостаточно клетчатки, слишком много простых углеводов и т. д.), возраст 50 лет и старше, повышенное артериальное давление, высокий уровень холестерина, дефицит тестостерона, однонуклеотидный полиморфизм гена металлотионеина 1 A (MT1A) в локусе rs8052394 (изменение G) и гестационный диабет в анамнезе. Таким образом, в различных вариантах осуществления субъект имеет один или более из этих факторов риска, и способ предназначен для замедления прогрессирования до Д2Т и/или (b) ограничения или предотвращения развития симптомов, характерных для Д2Т.

Как раскрыто в приведенных ниже примерах, способы значительно улучшают толерантность к глюкозе в мышиной модели Д2Т. Таким образом, в еще одном варианте осуществления субъект страдает от Д2Т, и способ предназначен для лечения Д2Т у субъекта. В этом варианте осуществления лечение может включать ограничение одного или более осложнений диабета 2 типа, включая, не ограничиваясь перечисленным, гипергликемию, гипогликемию, инсулинорезистентность, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, протеинурию, нарушение гломерулярного клиренса, связанные с диабетом нарушения кровообращения, почечную недостаточность, сердечно-сосудистое заболевание, полиурию, полидипсию, потерю массы тела, инсульт и снижение частоты потребности в инсулине или другой терапии. Любое ограничение этих симптомов/осложнений приносит большую пользу субъекту, страдающему от Д2Т. В одном из вариантов осуществления лечение может включать снижение уровней глюкозы в крови (мг/дл) на 10%, 15%, 20% или более, например, в течение 20-120 минут после введения ингибитора.

В еще одном варианте осуществления субъект страдает от предиабета, и способ предназначен для лечения предиабета у субъекта. В этом варианте субъект представляет собой субъекта, страдающего от предиабета. В контексте настоящего документа термин «предиабет» относится к состоянию, соответствующему некоторым, но не всем диагностическим критериям диабета. Таким образом, субъект, страдающий от предиабета, может: (a) иметь нарушение толерантности к глюкозе натощак – состояние, при котором ответ бета-клеток на пероральную глюкозную нагрузку (OGT) является недостаточным, или (b) может иметь постоянно повышенные уровни глюкозы натощак (IFG) – состояние, при котором уровень глюкозы в крови натощак выше уровня, считающегося нормальным, но недостаточно высок, чтобы его можно было классифицировать как сахарный диабет. Преддиабетное состояние может быть связано с инсулинорезистентностью и повышенным риском сердечно-сосудистой патологии. Люди в преддиабетном состоянии имеют

относительно высокий риск развития Д2Т. Способы согласно изобретению могут быть использованы для лечения субъекта, страдающего от предиабета, например, путем ограничения или замедления прогрессирования одного или более осложнений предиабета, включая, не ограничиваясь перечисленным, Д2Т, гипергликемию, инсулинорезистентность и/или сердечно-сосудистое заболевание. В одном из вариантов осуществления лечение может включать снижение уровней глюкозы в крови (мг/дл) на 10%, 15%, 20% или более, например, в течение 20-120 минут после введения ингибитора.

В еще одном варианте осуществления субъект страдает от нарушения толерантности к глюкозе, и способ предназначен для лечения нарушения толерантности к глюкозе у субъекта. В контексте настоящего документа термин «нарушение толерантности к глюкозе» определен как уровень глюкозы через два часа после введения, равный от 140 до 199 мг на дл (от 7,8 до 11,0 ммоль/л), в пероральном глюкозотолерантном тесте с 75 граммами глюкозы. Считается, что пациент страдает от IGT, когда он/она имеет умеренно повышенный уровень глюкозы через 2 часа, который при этом ниже уровня, соответствующего критериям сахарного диабета 2 типа. Уровень глюкозы натощак может быть как нормальным, так и умеренно повышенным. Нарушение толерантности к глюкозе является преддиабетическим состоянием гипергликемии, связанным с инсулинорезистентностью и повышенным риском сердечно-сосудистой патологии. IGT может возникнуть за много лет до развития сахарного диабета 2 типа. В этом варианте осуществления лечение может включать ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений нарушения толерантности к глюкозе, включая, не ограничиваясь перечисленным, диабет 2 типа, гипергликемию, инсулинорезистентность и/или сердечно-сосудистое заболевание. В одном из вариантов осуществления лечение может включать снижение уровней глюкозы в крови (мг/дл) на 10%, 15%, 20% или более, например, в течение 20-120 минут после введения ингибитора.

В еще одном варианте осуществления субъект страдает от гепатита, и способ предназначен для лечения гепатита у субъекта. Как раскрыто в приведенных ниже примерах, ингибиторы MT эффективны в ограничении воспаления тканей и уменьшали провоспалительные цитокины MCP-1 и TNF-a, в то же время увеличивая противовоспалительный сигнал IL-10 в ткани печени. Гепатит представляет собой воспаление ткани печени. Симптомы включают, не ограничиваясь перечисленным, желтое окрашивание кожи и склер глаз, снижение аппетита, рвоту, утомляемость, боль в животе, диарею, острую печеночную недостаточность, рубцевание печени, печеночную недостаточность или рак печени. Наиболее распространенными причинами гепатита являются вирусные инфекции (типы A, B, C, D и E), злоупотребление алкоголем,

некоторые лекарственные средства, токсины, другие инфекции, аутоиммунные заболевания и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). Таким образом, в различных вариантах осуществления лечение может включать ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений гепатита, включая, не ограничиваясь перечисленным, желтое окрашивание кожи и/или склер глаз, снижение аппетита, рвоту, утомляемость, боль в животе, диарею, острую печеночную недостаточность, рубцевание печени, печеночную недостаточность и рак печени.

В дополнительном варианте осуществления субъект страдает от воспалительного заболевания печени, и способ предназначен для лечения воспалительного заболевания печени у субъекта. В контексте настоящего документа термин «воспалительное заболевание печени» относится к состоянию, связанному с внутрицитоплазматическим накоплением больших вакуолей триглицеридного жира в клетках печени посредством стеатоза (т. е. патологического удержания липидов в клетке). Печень играет большую роль в системном метаболизме, и нарушение энергетического баланса связано, в частности, с нарушениями липидного обмена в печени. В частности, ожирение и инсулинорезистентность часто связаны с повышенным отложением липидов в печени, характерным для неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Хотя липидный обмен очень динамичен, хронический избыток липидов вызывает повреждение тканей печени, что приводит к рекрутированию нерезидентных и резидентных иммунных клеток печени, которые могут вызывать фиброз, характерный для неалкогольного стеатогепатита (НАСГ). Фиброз печени может привести к циррозу, раку и значительно увеличивает риск сердечно-сосудистого заболевания. Этот факт говорит в пользу возможности блокирования рекрутинга иммунных клеток в печень для снижения рисков неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Как показано в приведенных ниже примерах, лечение ингибитором MT способствовало увеличению влажной массы эпидидимальной белой жировой ткани и снижению уровней общих триглицеридов, а также снижению провоспалительных цитокинов MCP-1 и TNF-a при одновременном увеличении противовоспалительного сигнала IL-10. Воспалительное заболевание печени может представлять собой стеатоз (неалкогольный жировой стеатоз печени (НАЖСП)). В еще одном варианте осуществления жировая болезнь печени может представлять собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), включая, не ограничиваясь перечисленным, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) – наиболее тяжелую форму НАЖБП. НАЖБП является одним из видов воспалительного заболевания печени, возникающим при отложении жира (стеатозе) в печени по причинам, отличным от чрезмерного употребления алкоголя. Симптомы НАСГ и НАЖБП могут включать, не

ограничиваясь перечисленным, утомляемость, недомогание, тупую боль в правом верхнем квадранте живота, легкую желтуху и отклонения биохимических показателей функции печени в общем анализе крови; осложнения НАСГ и НАЖБП могут включать, не ограничиваясь перечисленным, фиброз печени, рак печени и/или цирроз печени. Таким образом, в одном из вариантов осуществления воспалительное заболевание печени выбрано из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и/или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). В дополнительном варианте осуществления лечение включает ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений воспалительного заболевания печени, включая, не ограничиваясь перечисленным, утомляемость, недомогание, фиброз печени, рак печени и/или цирроз печени.

В одном из вариантов осуществления ингибитор МТ, включая, не ограничиваясь перечисленным, антитело к МТ, может быть связан с фрагментом, нацеленным на клетки поджелудочной железы, чтобы специфически нацеливаться на клетки поджелудочной железы, вырабатывающие МТ, такие как бета-клетки поджелудочной железы. Этот вариант осуществления будет особенно эффективен для лечения или ограничения развития Д1Т, Д2Т, предиабета и/или нарушения толерантности к глюкозе. В одном из вариантов осуществления фрагмент, специфичный к β-клеткам поджелудочной железы, содержит один или более пептидов или других фрагментов, избирательно связывающих β-клетки поджелудочной железы, включая, не ограничиваясь перечисленным, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), пептид YY (PYY), нейропептид Y (NPY), пептид поджелудочной железы (PPY) и эксендин-4.

Глюкагоноподобный пептид 1; GLP1(амк.92-128)
HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 9)

Глюкагоноподобный пептид 2; GLP2(амк.146-178)
HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (SEQ ID NO: 10)

пептид поджелудочной железы (PPY)
MAAARLCLSLLLLSTCVALLLQPLLGAQGAPLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRYGKRHKEDTLAFS
EWGSPHAAVPRELSPLDL (SEQ ID NO: 11)

нейропептид Y (NPY)
MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDL
LMRESTENVPRTRLEDPAMW (SEQ ID NO: 12)

пептид YY (PYY)

MVFVRRPWPALTTVLLALLVCLGALVDAYPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRYGKRDGPDTLLSKT
FFPDGEDRPVRSRSEGPDLW (SEQ ID NO: 13)

эксендин-4

MKIILWLCVFGLFLATLFPISWQMPVESGLSSEDSASSESFASKIKRHGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGG
PSSGAPPPSG (SEQ ID NO: 14)

Присоединение фрагмента, нацеленного на клетки поджелудочной железы, к ингибитору МТ, включая, не ограничиваясь перечисленным, антитело к МТ или его фрагмент, или аптамер, может быть осуществлено посредством любой химической реакции, которая будет связывать две молекулы, при условии, что фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы, и антитело к МТ или его фрагмент, или аптамер сохраняют их соответствующие активности. В одном из вариантов осуществления, где ингибитор внеклеточного МТ содержит антитело или его фрагмент, композиция содержит рекомбинантный слитый белок. В других вариантах осуществления связь между фрагментом, нацеленным на клетки поджелудочной железы, и антителом к МТ или его фрагментом может включать множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Ковалентное связывание может быть достигнуто либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем включения внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные связывающие агенты пригодны для связывания белковых молекул, таких как антитела, с другими молекулами. Например, в качестве иллюстративных неограничивающих примеров связывающих агентов можно упомянуть органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимидов, диизоцианаты, глутаральдегиды, диазобензолы и гексаметилендиамины.

Во всех вариантах осуществления субъект может представлять собой любого субъекта, которому могут принести пользу способы лечения, раскрытые в настоящем документе, включая млекопитающих, людей, крупный рогатый скот, собак, кошек, лошадей, кур и так далее. В одном из вариантов осуществления субъект представляет собой человека.

Композиции для введения обычно готовят в виде фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие кислоты, которые способны образовывать фармацевтически приемлемые соли, включают неорганические кислоты, такие как соляная кислота, бромистоводородная кислота, хлорная кислота, азотная кислота, тиоциановая кислота, серная кислота, фосфорная кислота и т. п.; и

органические кислоты, такие как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, антраниловая кислота, коричная кислота, нафталинсульфоновая кислота, сульфаниловая кислота и т. п. Подходящие основания, способные образовывать такие соли, включают неорганические основания, такие как гидроксид натрия, гидроксид аммония, гидроксид калия и т. п.; и органические основания, такие как моно-, ди- и триалкил- и ариламины (например, триэтиламин, диизопропиламин, метиламин, диметиламин и т. п.) и необязательно замещенные этаноламины (например, этаноламин, диэтаноламин и т. п.).

Фармацевтическая композиция может содержать, помимо композиции и носителя, (a) лиопротектор; (b) поверхностно-активное вещество; (c) объемообразующий агент; (d) агент, регулирующий тоничность; (e) стабилизатор; (f) консервант и/или (g) буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер в составе фармацевтической композиции представляет собой трис-буфер, гистидиновый буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер или ацетатный буфер. Фармацевтическая композиция также может включать лиопротектор, например, сахарозу, сорбит или трегалозу. В отдельных вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает консервант, например, бензалкония хлорид, бензетоний, хлоргексидин, фенол, м-крезол, бензиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлорбутанол, о-крезол, п-крезол, хлоркрезол, нитрат фенилртути, тимеросал, бензойную кислоту и различные их смеси. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает объемообразующий агент, такой как глицин. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает поверхностно-активное вещество, например, полисорбат-20, полисорбат-40, полисорбат-60, полисорбат-65, полисорбат-80, полисорбат-85, полоксамер-188, сорбитанмонолаурат, сорбитанмонопальмитат, сорбитанмоностеарат, сорбитанмоноолеат, сорбитантрилаурат, сорбитантристеарат, сорбитантриолеат или их комбинацию. Фармацевтическая композиция также может включать агент, регулирующий тоничность, например, соединение, делающее препарат по существу изотоничным или изоосмотичным крови человека. Примеры агентов, регулирующих тоничность, включают сахарозу, сорбит, глицин, метионин, маннит, декстрозу, инозитол, хлорид натрия, аргинин и гидрохлорид аргинина. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает стабилизатор, например, молекулу, которая, будучи в комбинации с композицией на белковой основе, по существу предотвращает или уменьшает химическую и/или физическую нестабильность белка в лиофилизированной

или жидкой форме. Примеры стабилизаторов включают сахарозу, сорбит, глицин, инозитол, хлорид натрия, метионин, аргинин и гидрохлорид аргинина.

Композиции могут быть введены любым подходящим способом, в том числе перорально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, ректально или местно в дозированных лекарственных формах, содержащих обычные фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и наполнители. В контексте настоящей заявки термин «парентеральный» включает способы подкожного, внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, интрастернального, внутрисухожильного, интраспинального, внутричерепного, внутригрудного, инфузионного или внутрибрюшинного введения. Режимы дозирования также можно регулировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Подходящий диапазон доз может составлять, например, от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг массы тела; в качестве альтернативы, он может составлять от 0,5 мкг/кг до 50 мг/кг; от 1 мкг/кг до 25 мг/кг или от 5 мкг/кг до 10 мг/кг массы тела. Композиция может быть доставлена в виде разового болюса или может быть введена более одного раза (например, 2, 3, 4, 5 или более раз), что определяет лечащий медицинский персонал. Композиции могут быть введены в виде единственного терапевтического средства или могут быть введены вместе с одним или более другими терапевтическими средствами (либо по отдельности, либо в комбинации), если это будет сочтено целесообразным лечащим медицинским персоналом. В одном неограничивающем варианте осуществления субъект страдает от Д1Т или подвержен риску его развития, и ингибитор может быть использован вместе с одним или более из инсулина, метформина или прамлинтида. В еще одном варианте осуществления субъект страдает от Д2Т, предиабета и/или нарушения толерантности к глюкозе или подвержен риску их развития, и ингибитор может быть использован вместе с одним или более из метформина, сульфонилмочевин (включая, не ограничиваясь перечисленным, глибурид, глипизид и глимепирид), меглитинидов (включая, не ограничиваясь перечисленным, репаглинид и натеглинид), тиазолидиндионов (включая, не ограничиваясь перечисленным, росиглитазон и пиоглитазон), ингибиторов DPP-4 (включая, не ограничиваясь перечисленным, ситаглиптин, саксаглиптин и линаглиптин), агонистов рецептора GLP-1 (включая, не ограничиваясь перечисленным, эксенатид, лираглутид и семаглутид), ингибиторов SGLT2 (включая, не ограничиваясь перечисленным, канаглифлозин, дапаглифлозин и эмпаглифлозин) или инсулина. В одном неограничивающем варианте осуществления субъект страдает от гепатита или подвержен риску его развития, и ингибитор может быть использован в комбинации с одним или

более из энтекавира, тенофовира, ламивудина, адефовира, телбивудина, симепревира, софосбувира, интерферона или рибавирина.

В еще одном варианте осуществления предложены композиции, содержащие

(a) ингибитор внеклеточного металлотионеина (MT) человека; и

(b) один или более из инсулина, метформина, прамлинтида, сульфонилмочевины (включая, не ограничиваясь перечисленным, глибурид, глипизид и глимепирид), меглитинида (включая, не ограничиваясь перечисленным, репаглинид и натеглинид), тиазолидиндиона (включая, не ограничиваясь перечисленным, росиглитазон и пиоглитазон), ингибитора DPP-4 (включая, не ограничиваясь перечисленным, ситаглиптин, саксаглиптин и линаглиптин), агониста рецептора GLP-1 (включая, не ограничиваясь перечисленным, эксенатид, лираглутид и семаглутид), ингибитора SGLT2 (включая, не ограничиваясь перечисленным, канаглифлозин, дапаглифлозин и эмпаглифлозин), энтекавира, тенофовира, ламивудина, адефовира, телбивудина, симепревира, софосбувира, интерферона или рибавирина. Композиции могут быть использованы, например, в способах согласно изобретению. В одном из вариантов осуществления ингибитор содержит антитело к металлотионеину или его фрагмент, специфически связывающийся с металлотионеином (MT) человека. Все варианты осуществления и комбинации вариантов осуществления антител, раскрытых выше, являются подходящими для включения в композиции согласно этому аспекту. В одном из вариантов осуществления антитело к MT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В еще одном варианте осуществления антитело к MT содержит гуманизированное антитело к MT или его антигенсвязывающий фрагмент.

В еще одном аспекте изобретения предложены композиции, содержащие:

(a) ингибитор внеклеточного металлотионеина (MT) человека; и

(b) фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы или печени, связанный с ингибитором внеклеточного MT человека.

Композиции могут быть использованы, например, в способах согласно изобретению. В одном из вариантов осуществления ингибитор содержит антитело к металлотионеину или его фрагмент, специфически связывающийся с металлотионеином (MT) человека. Все варианты осуществления и комбинации вариантов осуществления антител, раскрытых выше, являются подходящими для включения в композиции согласно этому аспекту. В одном из вариантов осуществления антитело к MT или его антигенсвязывающий фрагмент содержит моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент. В еще одном варианте осуществления антитело к МТ содержит гуманизированное антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном из вариантов осуществления фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки печени. В таких иллюстративных вариантах осуществления фрагмент, нацеленный на клетки печени, включает, не ограничиваясь перечисленным, циркумспорозоитный белок (CSP), область I CSP, область I-плюс CSP, лактозаминированный сывороточный альбумин человека, гликозилированный липопротеин и/или арабиногалактан. В одном из вариантов осуществления фрагмент, связывающий клетки печени, является пептидным и выбран из CSP, области I CSP, области I-плюс CSP или их фрагментов, связывающих клетки печени. CSP нацеливает спорозоит *Plasmodium* на печень вследствие циркумспорозоитного белка (CSP), присутствующего на поверхности спорозоита *Plasmodium* (Rathore D, et al. *The Journal of Biological Chemistry*.2005;280(21):20524–20529). CSP имеет длину приблизительно 400 аминокислот, организованных в три домена: N-концевой домен, содержащий консервативный мотив KLKQP, называемый «область I», центральный домен с высоким содержанием повторяющихся последовательностей и С-концевой домен, содержащий другую консервативную последовательность, называемую «область II» (Singh et al. *Cell*.2007;131(3):492–504). Помимо консервативной последовательности KLKQP области I N-концевая область также содержит две консенсусные последовательности, связывающие гепаринсульфат, расположенные выше области I. Пептиды, содержащие как консервативные аминокислоты области I, так и две консенсусные последовательности, связывающие гепарин, выше области I, были названы «область I-плюс» (Prudêncio et al., *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(11):849–856).

В еще одном варианте осуществления фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы, включая, не ограничиваясь перечисленным, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), пептид YY (PYY), нейропептид Y (NPY), пептид поджелудочной железы (PPY) и эксендин-4; иллюстративные аминокислотные последовательности таких пептидов описаны выше.

Присоединение фрагмента, нацеленного на клетки, к ингибитору МТ, включая, не ограничиваясь перечисленным, антитело к МТ или его фрагмент, или аптамер, может быть осуществлено посредством любой химической реакции, которая будет связывать две молекулы, при условии, что фрагмент, нацеленный на клетки, и антитело к МТ или его фрагмент, или аптамер сохраняют их соответствующие активности. В одном из вариантов осуществления, где ингибитор внеклеточного МТ содержит антитело или его фрагмент, и

фрагмент, нацеленный на клетки, является пептидным, композиция содержит рекомбинантный слитый белок. В других вариантах осуществления связь между фрагментом, нацеленным на клетки, и антителом к МТ или его фрагментом может включать множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Ковалентное связывание может быть достигнуто либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем включения внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные связывающие агенты пригодны для связывания белковых молекул, таких как антитела, с другими молекулами. Например, в качестве иллюстративных неограничивающих примеров связывающих агентов можно упомянуть органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимидов, диизоцианаты, глутаральдегиды, диазобензолы и гексаметилендиамины.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантные слитые полипептиды антител к МТ или их фрагменты, слитые с пептидными нацеливающими фрагментами, включая специально раскрытые в настоящем документе. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать одноцепочечную или двухцепочечную РНК или ДНК и их производные. Такие рекомбинантные последовательности нуклеиновых кислот могут содержать дополнительные последовательности, подходящие для способствования экспрессии и/или очистке кодируемого белка, включая, не ограничиваясь перечисленным, последовательности полиА, модифицированные последовательности Козак и последовательности, кодирующие эпитопные метки, сигналы экспорта и сигналы секреции, сигналы ядерной локализации и сигналы локализации в плазматической мембране.

В дополнительном аспекте раскрыты рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту согласно любому из вариантов осуществления или комбинации вариантов осуществления изобретения, функционально связанную с подходящей регуляторной последовательностью. «Рекомбинантный вектор экспрессии» включает векторы, функционально связывающие кодирующую область нуклеиновой кислоты или ген с любыми регуляторными последовательностями, способными осуществлять экспрессию продукта гена. «Регуляторные последовательности», функционально связанные с последовательностями нуклеиновых кислот согласно изобретению, представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, способные осуществлять экспрессию молекул нуклеиновых кислот. Регуляторные

последовательности не обязательно должны быть смежными с последовательностями нуклеиновых кислот при условии, что они выполняют функцию управления их экспрессией. Таким образом, например, между последовательностью промотора и последовательностями нуклеиновых кислот могут присутствовать промежуточные нетранслированные, но транскрибированные последовательности, и последовательность промотора по-прежнему может считаться «функционально связанной» с кодирующей последовательностью. Другие такие регуляторные последовательности включают, не ограничиваясь перечисленным, сигналы полиаденилирования, сигналы терминации и сайты связывания рибосомы. Такие векторы экспрессии могут быть любого типа, включая, не ограничиваясь перечисленным, плазмидные и вирусные векторы экспрессии. Вектор экспрессии может иметь возможность реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписомы, либо путем встраивания в хромосомную ДНК хозяина. В неограничивающих вариантах осуществления вектор экспрессии может содержать плазмиду или вирусный вектор.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие рекомбинантные векторы экспрессии, раскрытые в настоящем документе, где клетки-хозяева могут быть прокариотическими либо эукариотическими, такими как клетки млекопитающих. Клетки могут быть временно или стабильно трансфицированы.

В еще одном варианте осуществления раскрыто применение композиций, рекомбинантных нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, рекомбинантных клеток-хозяев или фармацевтических композиций согласно любому из вариантов осуществления или комбинации вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, для лечения или ограничения развития расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени. Такие применения соответствуют описанным выше.

В дополнительном варианте осуществления раскрыты способы лечения или ограничения развития расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени, путем введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного для лечения указанного расстройства количества композиций, рекомбинантных нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, рекомбинантных клеток-хозяев или фармацевтических композиций согласно любому из вариантов осуществления или

комбинации вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Такие способы соответствуют описанным выше.

Примеры

Лечение диабета 2 типа с помощью UC1MT

Чтобы смоделировать инсулинорезистентность, характерную для диабета 2 типа, авторы кормили мышей рационом с высоким содержанием жиров (HFD). Мышам C57BL/6J в возрасте пять недель давали стандартный рацион с высоким 60% содержанием жиров в течение 14 недель до начала лечения. Мышам дважды в неделю в/б вводили 100 мкл 1 мг/мл антитела к MT (UC1MT; получено от Abcam Inc, Кембридж, Массачусетс) в течение восьми недель, а затем мышей умерщвляли в возрасте 27 недель (в общей сложности 22 недели HFD). Между двумя группами, получавшими лечение, не наблюдалось никакой разницы ни в массе тела, ни в потреблении пищи. На фигуре 1 показаны результаты глюкозотолерантного теста у мышей, получивших внутрибрюшинную инъекцию глюкозы после курса лечения контрольным изотипическим IgG1 (MOPC21) или UC1MT. На фигуре 2 показано изменение результатов глюкозотолерантного теста, нормированное к исходному показателю для каждого животного в группе. У контрольных животных развилась жировая инфильтрация печени и нарушение толерантности к глюкозе, однако мыши, получившие UC1MT, продемонстрировали улучшенную толерантность к глюкозе по сравнению с контрольной группой. Эти данные демонстрируют, что антитела к MT могут быть использованы для лечения нарушения толерантности к глюкозе. Поскольку толерантность к глюкозе может модулироваться воспалительным статусом, эти результаты также дают основания полагать, что UC1MT улучшает воспалительный профиль мышей и, таким образом, улучшает способность мышей, получающих HFD, справляться с высокой глюкозной нагрузкой.

Влияние на воспалительный профиль печени при НАСГ (неалкогольном стеатогепатите) у мышей, получавших HFD, получавших лечение с помощью UC1MT или MOPC21

Печень играет большую роль в системном метаболизме, и нарушение энергетического баланса связано, в частности, с нарушениями липидного обмена в печени. В частности, ожирение и инсулинорезистентность часто связаны с повышенным отложением липидов в печени, характерным для неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) (Katsiki N et al, Metabolism 2016 PMID: 27237577). Хотя липидный обмен очень

динамичен (Sakaguchi M et al, Cell Metab 2017 PMID: 28065828), хронический избыток липидов вызывает повреждение тканей печени, что приводит к рекрутированию нерезидентных и резидентных иммунных клеток печени, которые могут вызывать фиброз, характерный для неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) (Narayanan S et al, Immune Netw 2016 PMID: 27340383). Фиброз печени может привести к циррозу, раку и значительно увеличивает риск сердечно-сосудистого заболевания. Этот факт говорит в пользу возможности блокирования рекрутинга иммунных клеток в печень для снижения рисков неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

Те же животные, которые были описаны выше в исследовании диабета 2 типа, были исследованы на фенотип печени путем оценки экспрессии мРНК с помощью исследований методом кПЦР. Лечение с помощью UC1MT оказало влияние на экспрессию некоторых генов в эпидидимальной белой жировой ткани (в особенности, гамма-коактиватора 1-альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PGC-1a), транскрипционного коактиватора, регулирующего энергетический обмен, и альфа-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (PPAR-гамма)) (**фигура 3**).

При умерщвлении животных собирали печень, поджелудочную железу, плоскоклеточную белую жировую ткань, eWAT, межлопаточную бурую жировую ткань и сыворотку. Половину каждого образца использовали для РНК, половину для гистологии (все ткани фиксировали в формалине, за исключением поджелудочной железы, которую фиксировали в Z-FIX™ (Fisher Scientific). Данные показывают, что антитело к MT было ответственным за:

- увеличение влажной массы эпидидимальной белой жировой ткани (**фигура 4A-B**);
- снижение уровня общих триглицеридов в печени (**фигура 6**);
- снижение экспрессии некоторых провоспалительных цитокинов (MCP-1 и TNF-a) (**фигура 5**); и
- повышение экспрессии противовоспалительного сигнала IL-10 (**фигура 5**)

Антитело к металлотионеину не изменяло массу тела или прирост массы тела у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, а также по существу не изменяло гистологию печени.

Мыши, получавшие антитела к MT, имели пониженные уровни триглицеридов в печени, что согласуется с улучшенной толерантностью к глюкозе, показанной выше. Эти данные свидетельствуют о том, что ингибиторы MT могут улучшать системный метаболизм глюкозы, что может снизить нагрузку избытка питательных веществ на печень и ограничить развитие гепатостеатоза.

Исследования диабета 1 типа

Линия мышей NOD/ShiLtJ (обычно называемая NOD) является полигенной моделью аутоиммунного диабета 1 типа. Диабет у мышей NOD характеризуется гипергликемией и инсулитом – лейкоцитарной инфильтрацией островков поджелудочной железы. Заметное снижение содержания инсулина в поджелудочной железе наблюдается у самок в возрасте приблизительно 12 недель и спустя несколько недель у самцов. У 80% самок и 45% самцов диабет развивается к 30 неделям; медиана заболеваемости у самок составляет 17 недель. Иммунные фенотипы на генетическом фоне NOD состоят из дефектов презентации антигенов, репертуара Т-лимфоцитов, функции NK-клеток, продукции цитокинов макрофагами, заживления ран и комплемента C5. Эти дефекты делают генетический фон NOD распространенным выбором линии мышей с иммунодефицитом.

- Авторы использовали самку мыши NOD (не страдающую ожирением) для исследования по предупреждению СД 1 типа, поскольку с момента описания мышей NOD в 1980 году было обнаружено, что у них спонтанно развивается СД 1 типа. Его патогенетические события проявляются по меньшей мере уже через 3 недели после рождения с появлением островковых антигенов в лимфатических узлах поджелудочной железы. Инсулит, сначала с АПК, а затем с лимфоцитами, начинается в возрасте приблизительно 4-6 недель и неуклонно прогрессирует в течение следующих 15 недель. Выраженный диабет при уровне сахара в крови > 250 мг/дл начинается между 18 и 20 неделями. Кроме того, частота возникновения спонтанного диабета у мышей NOD составляет 60-80% у самок и 20-30% у самцов. Таким образом, авторы решили разделить мышей NOD на 3 группы (по 10 животных на группу, получавшую лечение): (1) лечение с помощью PBS в качестве отрицательного контроля, (2) терапия неспецифическим IgG в количестве 0,1 мг/мл, MOPC в качестве изотипического контроля и (3) ежедневная внутрибрюшинная инъекция 0,1 мг/мл UCIMT на мышь, чтобы исследовать потенциальную роль моноклонального антитела к MT при СД 1T. Каждая группа получала назначенное лечение, начиная с 5-недельного возраста. В общей сложности курс терапии составил 2 недели. Уровни глюкозы в крови проверяли еженедельно, и мышей, уровень глюкозы в крови у которых превышал 250 мг/дл в течение 2 недель, умерщвляли. Остальных мышей NOD без диабета умерщвляли в возрасте 30 недель. Как показано на **фигуре 7** и **фигуре 8**, лечение антителами к MT привело к значительному снижению нарушения толерантности к глюкозе у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, по сравнению с

изотипическим контролем MOPC21 или контролем носителем PBS. UC1MT также привело к значительному снижению инсулита (т. е. инфильтрации воспалительными клетками островков Лангерганса поджелудочной железы) (**фигура 9**).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или ограничения развития расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени, включающий введение субъекту, страдающему от указанного расстройства или подверженному риску развития указанного расстройства, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор внеклеточного металлотионеина (MT) человека, для лечения или ограничения развития указанного расстройства.

2. Способ по п. 1, где субъект страдает от диабета или подвержен риску развития диабета, и указанный способ предназначен для лечения или ограничения развития диабета.

3. Способ по п. 2, где субъект подвержен риску развития диабета 1 типа, и указанный способ предназначен для ограничения развития диабета 1 типа у субъекта.

4. Способ по п. 3, где субъект имеет один или более факторов риска развития диабета 1 типа, включая, не ограничиваясь перечисленным, родителя, брата или сестру с диабетом 1 типа, опухоль поджелудочной железы, панкреатит, аутоантитела к островковым клеткам поджелудочной железы, аутоантитела к инсулину, аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (GADA), инсулинома-ассоциированные (IA-2) аутоантитела, аутоантитела к транспортеру цинка (ZnT8), варианты гена IDDM1, выбранные из группы, состоящей из DRB1 0401, DRB1 0402, DRB1 0405, DQA 0301, DQB1 0302 и DQB1 0201; полиурию, полидипсию, сухость во рту, полифагию, утомляемость или потерю массы тела.

5. Способ по п. 2, где субъект страдает от диабета 1 типа, и способ предназначен для лечения диабета 1 типа у субъекта.

6. Способ по п. 5, где лечение включает одно или более из снижения частоты необходимости введения инсулина; замедления развития или прогрессирования осложнений диабета 1 типа у субъекта, включая, не ограничиваясь перечисленным, разрушение бета-клеток поджелудочной железы, гипергликемию, гипогликемию, полиурию, полифагию, полидипсию, потерю массы тела, нечеткость зрения, утомляемость, снижение способности к заживлению ран, инфекции мочевыводящих путей, нарушение половой функции, сухость во рту, диабетический кетоацидоз, сердечно-

сосудистое заболевание, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, инсульт, почечную недостаточность и язвы стопы; и отсрочки необходимости трансплантации поджелудочной железы или островковых клеток поджелудочной железы.

7. Способ по п. 2, где субъект подвержен риску развития диабета 2 типа, и способ предназначен для ограничения развития диабета 2 типа у субъекта.

8. Способ по п. 7, где субъект имеет один или более факторов риска развития диабета 2 типа, включая, не ограничиваясь перечисленным, ожирение, курение, малоподвижный образ жизни, родителя, брата или сестру с диабетом 2 типа, предиабет, родителя, брата или сестру с предиабетом, привычки к нездоровому питанию (например: слишком много жира, недостаточно клетчатки, слишком много простых углеводов и т. д.), возраст 50 лет или старше, повышенное артериальное давление, высокий уровень холестерина, дефицит тестостерона, однонуклеотидный полиморфизм гена металлотионеина 1 A (MT1A) в локусе rs8052394 (изменение G) и гестационный диабет в анамнезе.

9. Способ по п. 2, где субъект страдает от диабета 2 типа, и способ предназначен для лечения диабета 2 типа у субъекта.

10. Способ по п. 9, где лечение включает ограничение одного или более осложнений диабета 2 типа, включая, но не ограничиваясь перечисленным, гипергликемию, гипогликемию, инсулинорезистентность, диабетическую нефропатию, диабетическую нейропатию, диабетическую ретинопатию, протеинурию, нарушение гломерулярного клиренса, связанные с диабетом нарушения кровообращения, почечную недостаточность, сердечно-сосудистое заболевание, полиурию, полидипсию, потерю массы тела, инсульт и снижение частоты потребности в инсулине или другой терапии.

11. Способ по п. 1, где субъект страдает от предиабета, и способ предназначен для лечения предиабета у субъекта.

12. Способ по п. 11, где лечение включает ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений предиабета, включая, не ограничиваясь перечисленным, диабет 2 типа, гипергликемию, инсулинорезистентность и/или сердечно-сосудистое заболевание.

13. Способ по п. 1, где субъект страдает от нарушения толерантности к глюкозе, и способ предназначен для лечения нарушения толерантности к глюкозе у субъекта.

14. Способ по п. 13, где лечение включает ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений нарушения толерантности к глюкозе, включая, не ограничиваясь перечисленным, диабет 2 типа, гипергликемию, инсулинорезистентность и/или сердечно-сосудистое заболевание.

15. Способ по п. 1, где субъект страдает от гепатита, и способ предназначен для лечения гепатита у субъекта.

16. Способ по п. 15, где лечение включает ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений гепатита, включая, но не ограничиваясь перечисленным, желтое окрашивание кожи и/или склер глаз, снижение аппетита, рвоту, утомляемость, боль в животе, диарею, острую печеночную недостаточность, рубцевание печени, печеночную недостаточность и рак печени.

17. Способ по п. 1, где субъект страдает от воспалительного заболевания печени, и способ предназначен для лечения воспалительного заболевания печени у субъекта.

18. Способ по п. 17, где воспалительное заболевание печени выбрано из группы, состоящей из неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и/или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

19. Способ по п. 17 или п. 18, где лечение включает ограничение или замедление прогрессирования одного или более осложнений воспалительного заболевания печени, включая, но не ограничиваясь перечисленным, утомляемость, недомогание, фиброз печени, рак печени и/или цирроз печени.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где ингибитор внеклеточного МТ человека содержит антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент и/или аптамер, специфически связывающиеся с внеклеточным МТ человека.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где ингибитор внеклеточного МТ человека содержит антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент.

22. Способ по п. 21, где антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент включает моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

23. Способ по п. 21 или п. 22, где антитело к МТ включает гуманизированное антитело к МТ или его антигенсвязывающий фрагмент.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где ингибитор внеклеточного МТ человека связан с фрагментом, нацеленным на клетки поджелудочной железы или печени.

25. Способ по п. 24, где фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы, содержащий один или более пептидов или других фрагментов, избирательно связывающих β-клетки поджелудочной железы, включая, но не ограничиваясь перечисленным, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), пептид YY (PYY), нейропептид Y (NPY), пептид поджелудочной железы (PPY) и эксендин-4.

26. Способ по п. 24, где фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки печени, включающий, не ограничиваясь перечисленным, циркумспорозоитный белок (CSP), область I CSP, область I-плюс CSP, лактозаминированный сывороточный альбумин человека, гликозилированный липопротеин и арабиногалактан.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где субъект представляет собой млекопитающее.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где субъект представляет собой человека.

29. Композиция, содержащая:

(a) ингибитор внеклеточного металлотионеина (МТ) человека; и

(b) фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы или печени, связанный с ингибитором внеклеточного МТ человека.

30. Композиция по п. 29, где ингибитор содержит антитело к металлотионеину или его фрагмент, специфически связывающийся с металлотионеином человека (MT).

31. Композиция по п. 30, где антитело к MT или его антигенсвязывающий фрагмент включает моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

32. Композиция по любому из пп. 30-31, где антитело к MT включает гуманизированное антитело к MT или его антигенсвязывающий фрагмент.

33. Композиция по любому из пп. 29-32, где фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки поджелудочной железы, выбранный из группы, состоящей из глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2), пептида YY (PYY), нейропептида Y (NPY), пептида поджелудочной железы (PPY) и эксендина-4.

34. Композиция по любому из пп. 29-32, где фрагмент, нацеленный на клетки, представляет собой фрагмент, нацеленный на клетки печени, выбранный из группы, состоящей из, и где фрагмент, нацеленный на клетки печени, включает, не ограничиваясь перечисленным, циркумспорозоитный белок (CSP), область I CSP, область I-плюс CSP, лактозаминированный сывороточный альбумин человека, гликозилированный липопротеин и арабиногалактан.

35. Композиция по любому из пп. 29-34, где фрагмент, нацеленный на клетки, является пептидным, и где композиция содержит рекомбинантный полипептид.

36. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный полипептид по п. 35.

37. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п. 36.

38. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая рекомбинантный вектор экспрессии по п. 37.

39. Композиция, содержащая:

(a) ингибитор внеклеточного металлотионеина (MT) человека; и

(b) один или более из инсулина, метформина, прамлинтида, сульфонилмочевины (включая, но не ограничиваясь перечисленным, глибурид, глипизид, и глимепирид), меглитинида (включая, но не ограничиваясь перечисленным, репаглинид и натеглинид), тиазолидиндиона (включая, но не ограничиваясь перечисленным, росиглитазон и пиоглитазон), ингибитора DPP-4 (включая, но не ограничиваясь перечисленным, ситаглиптин, саксаглиптин и линаглиптин), агониста рецептора GLP-1 (включая, но не ограничиваясь перечисленным, эксенатид, лираглутид и семаглутид), ингибитора SGLT2 (включая, но не ограничиваясь перечисленным, канаглифлозин, дапаглифлозин и эмпаглифлозин), энтекавира, тенофовира, ламивудина, адефовира, телбивудина, симепревира, софосбувира, интерферона или рибавирина.

40. Композиция по п. 39, где ингибитор содержит антитело к металлотионеину или его фрагмент, специфически связывающийся с металлотионеином (MT) человека.

41. Композиция по п. 40, где антитело к MT или его антигенсвязывающий фрагмент включает моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

42. Композиция по любому из пп. 39-41, где антитело к MT включает гуманизированное антитело к MT или его антигенсвязывающий фрагмент.

43. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) композицию по любому из пп. 29-35 или 39-42, рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п. 36, рекомбинантный вектор экспрессии по п. 37 или рекомбинантную клетку-хозяина по п. 38; и

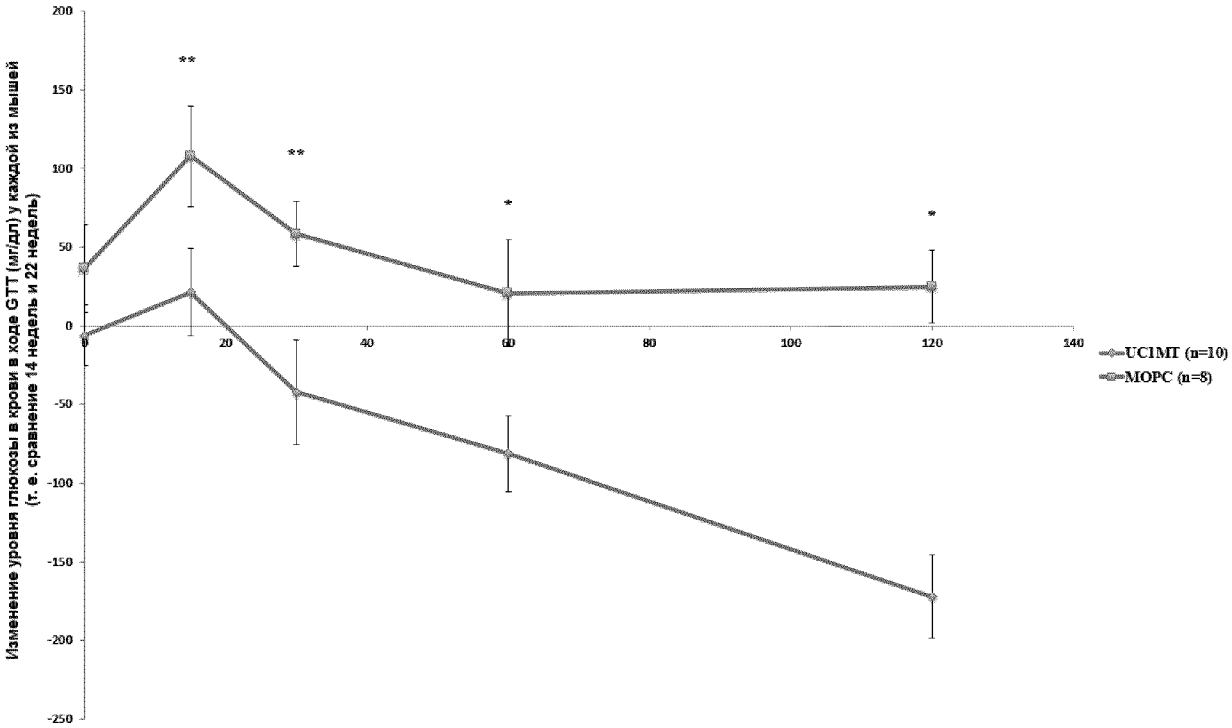
(b) фармацевтически приемлемый носитель.

44. Применение композиции по любому из пп. 29-35 или 39-42, рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 36, рекомбинантного вектора экспрессии по п. 37 или рекомбинантной клетки-хозяина по п. 38, или фармацевтической композиции по п. 43, для лечения или ограничения развития расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета, предиабета, нарушения толерантности к глюкозе, гепатита и/или воспалительного заболевания печени.

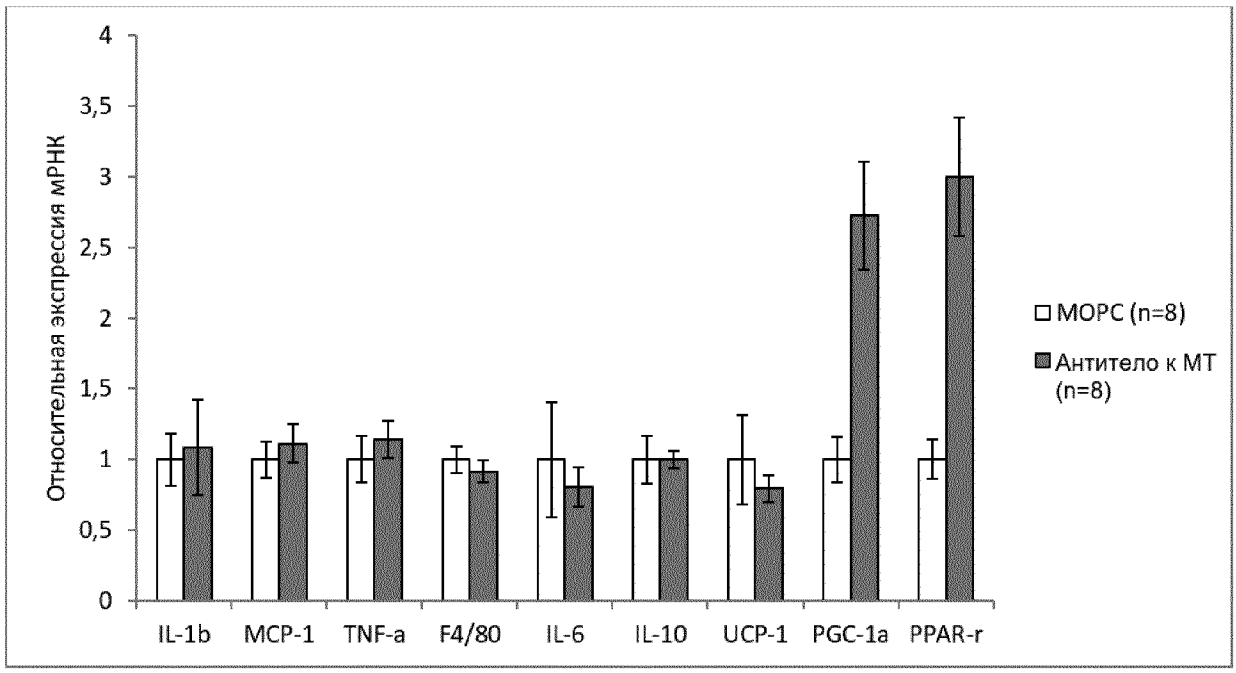
45. Способ по любому из пп. 1-28, где ингибитор внеклеточного МТ человека содержит композицию по любому из пп. 29-35 или 39-42, рекомбинантную нуклеиновую кислоту по п. 36, рекомбинантный вектор экспрессии по п. 37 или рекомбинантную клетку-хозяина по п. 38, или фармацевтическую композицию по п. 43.

ipGTT
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
600
500
400
300
200
100
0
-30
20
70
120
Минут после инъекции
UC1MT (n=10)
MOPC (n=8)

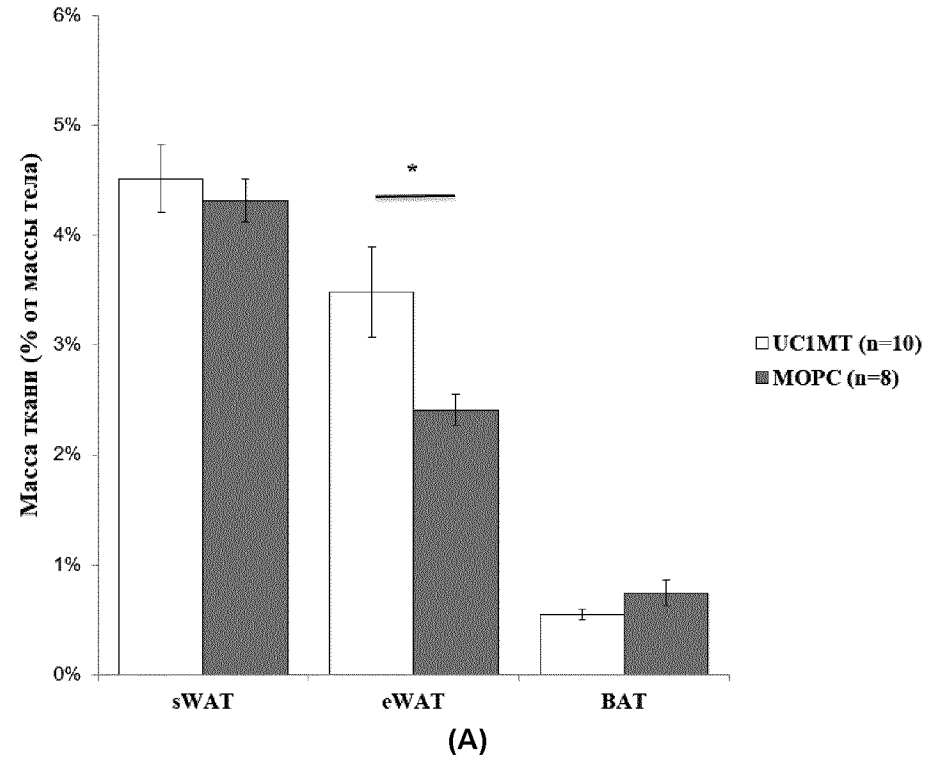
ФИГ. 1


Изменение уровня глюкозы в крови в ходе GTT (мг/дл) у каждой из мышей
(т. е. сравнение 14 недель и 22 недель)
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
0
20
40
60
80
100
120
140
**
**
*
*
UC1MT (n=10)
MOPC (n=8)

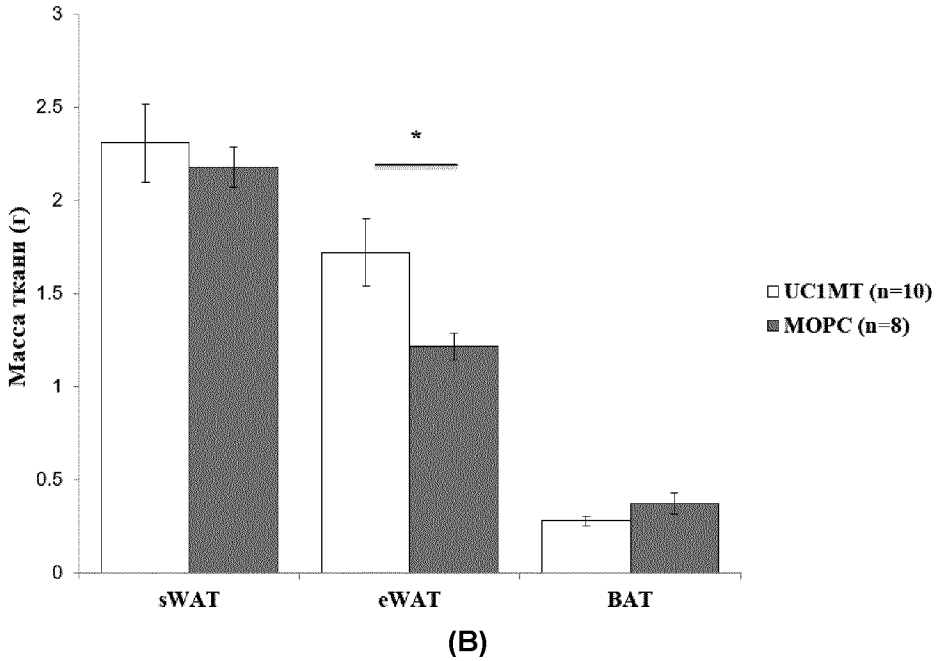
ФИГ. 2


Относительная экспрессия мРНК
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
IL-1b
MCP-1
TNF-a
F4/80
IL-6
IL-10
UCP-1
PGC-1a
PPAR-r
МОРС (n=8)
Антитело к МТ (n=8)

ФИГ. 3

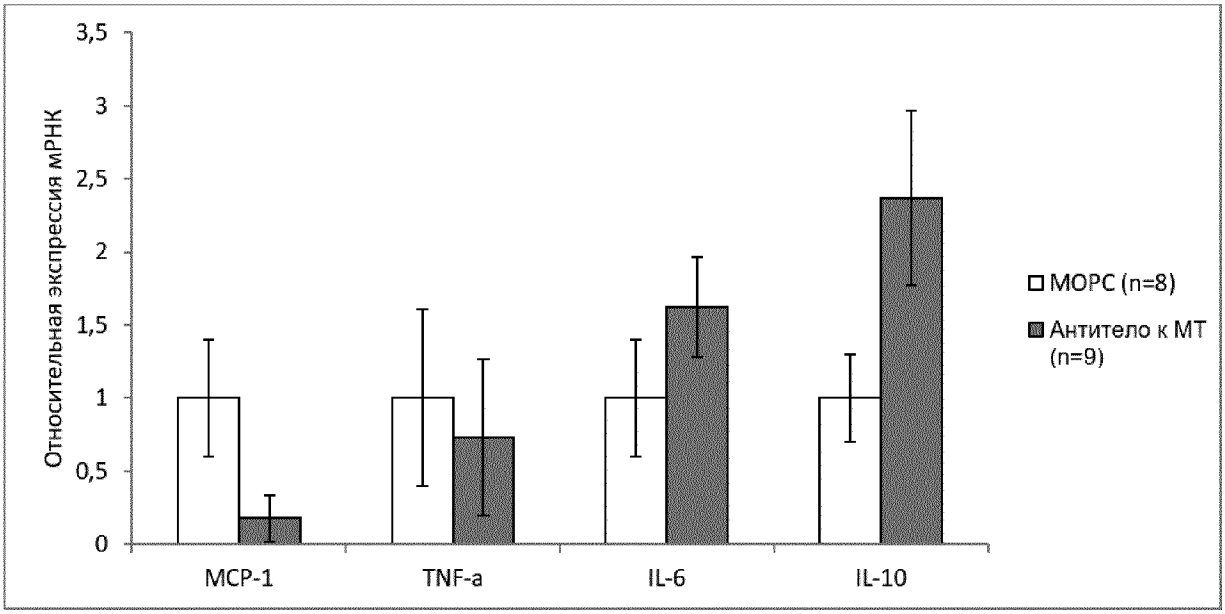

6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
Масса ткани (% от массы тела)
*
sWAT
eWAT
BAT
UC1MT (n=10)
MOPC (n=8)

(A)

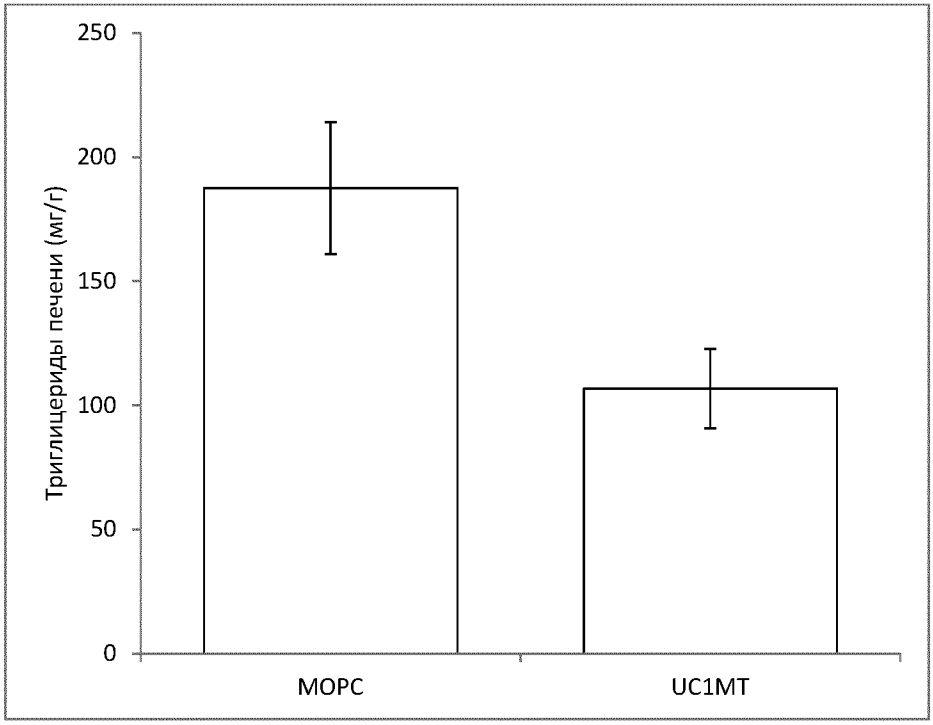

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Масса ткани (г)
*
sWAT
eWAT
BAT
UC1MT (n=10)
MOPC (n=8)

(B)

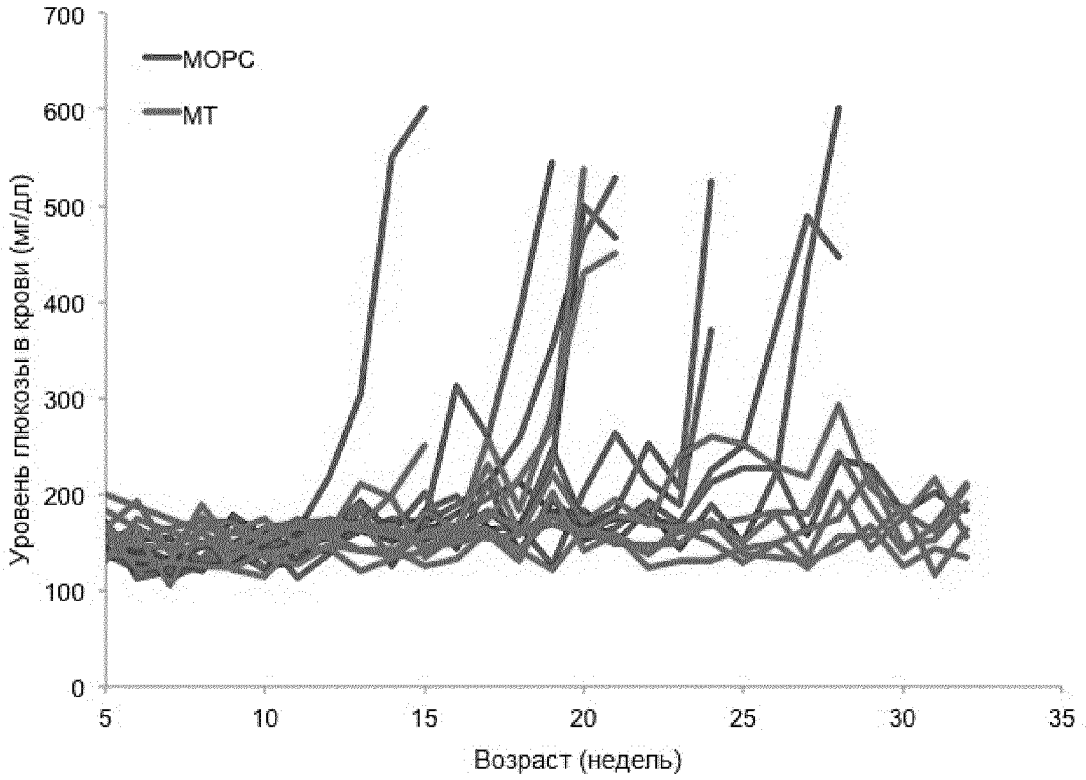
ФИГ. 4


Относительная экспрессия мРНК
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
MCP-1
TNF-a
IL-6
IL-10
МОРС (n=8)
Антитело к МТ (n=9)

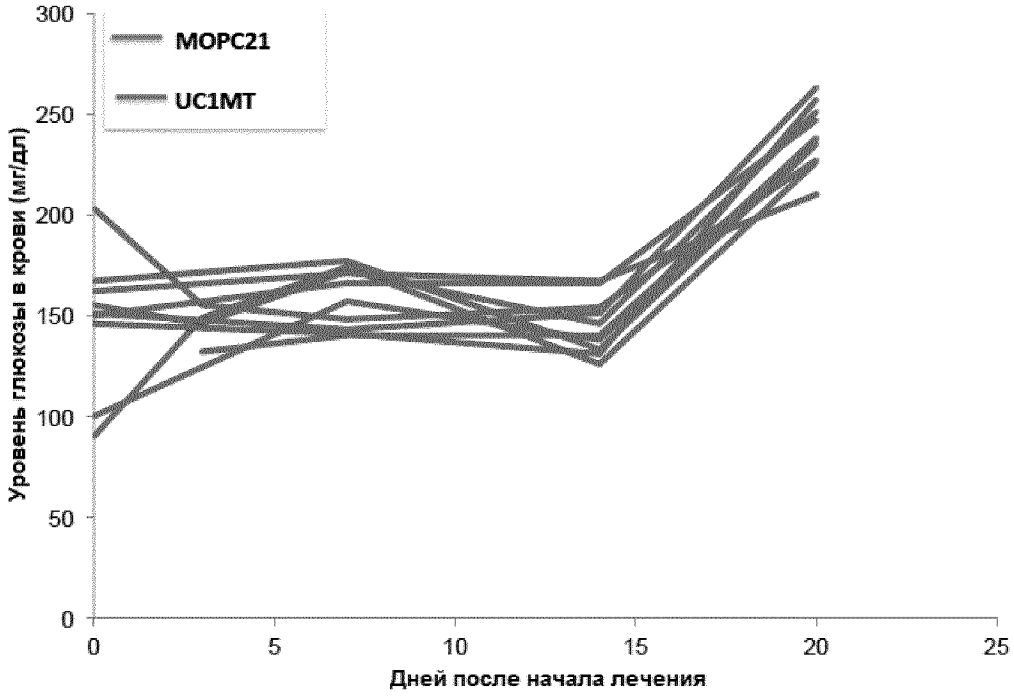
ФИГ. 5



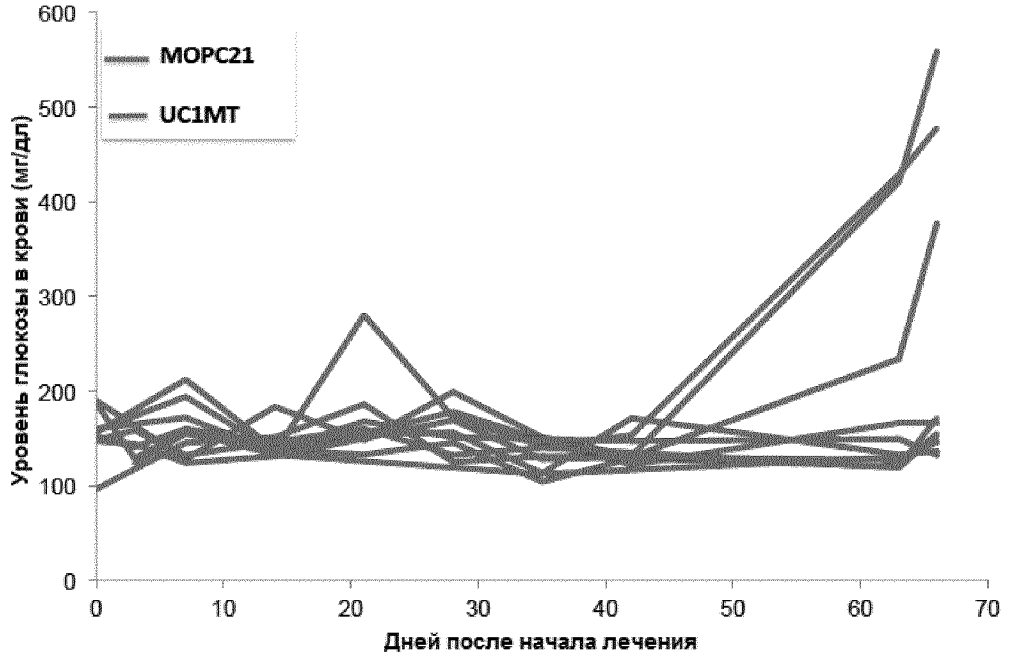
ФИГ. 6


700
600
500
400
300
200
100
0
МОРС
МТ
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
5
10
15
20
25
30
35
Возраст (недель)

ФИГ. 7

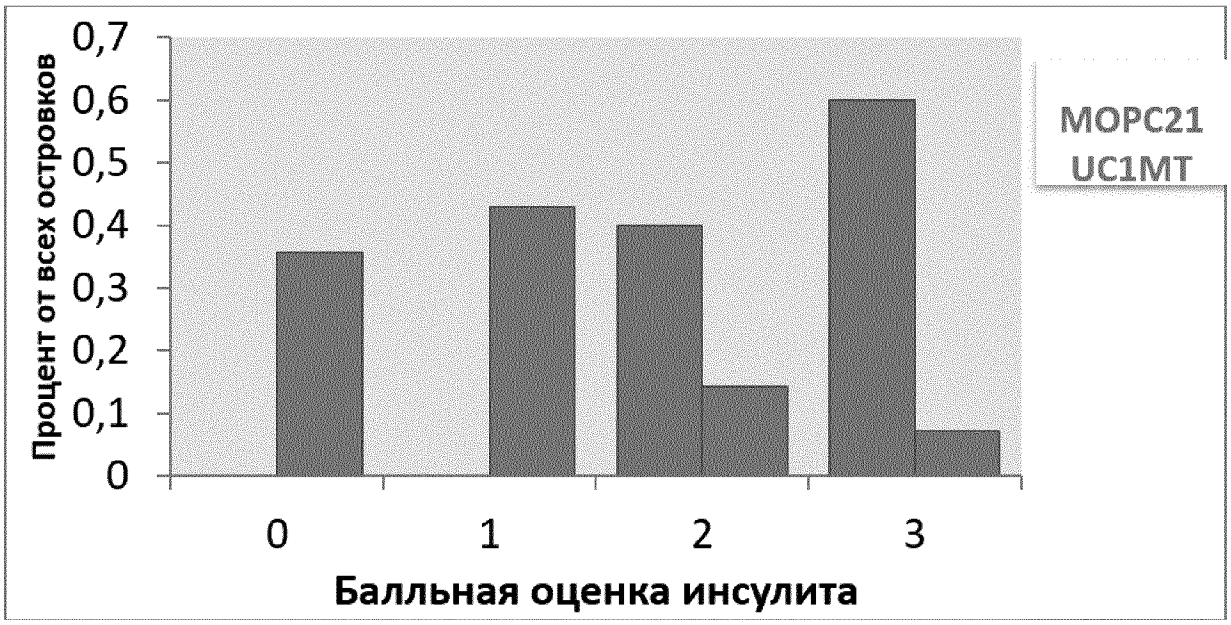

MOPC21
UC1MT
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
Дней после начала лечения

(A)


MOPC21
UC1MT
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Дней после начала лечения

(B)

ФИГ. 8


Процент от всех островков
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
1
2
3
Балльная оценка инсулита
MOPC21
UC1MT

ФИГ. 9