

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037799**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.21

(51) Int. Cl. **C07K 7/06** (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

(21) Номер заявки
201792365

(22) Дата подачи заявки
2015.05.12

(54) ПЕПТИДЫ С АКТИВНОСТЬЮ, ПРЕПЯТСТВУЮЩЕЙ ОЖИРЕНИЮ ИЛИ ДИАБЕТУ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 10-2015-0059648

(32) 2015.04.28

(33) KR

(43) 2018.04.30

(86) PCT/KR2015/004749

(87) WO 2016/175362 2016.11.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАРЕДЖЕН КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Чунг Йонг Жи, Ким Эюн Ми (KR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KR-A-1020140134083
NCBI, GenBank accession no. EDL89718.1
(20 June 2007) See the entire document.
NCBI, GenBank accession no. ABG01984.1
(05 March 2009) See the entire document.
KR-A-1020140027594
US-A-6087334
US-A1-20140018291

(57) Настоящее изобретение относится к пептидам и их пептидному комплексу с активностью, препятствующей ожирению или диабету за счет уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC, aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов pHSL, AMPK- α 1, CGI-58, ATGL. Также изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные пептиды или пептидный комплекс, для профилактики и лечения ожирения или диабета, а также их использованию в соответствующих способах.

B1

037799

037799

B1

Область техники

Эта заявка притязает на приоритет заявки на патент республики Корея с № 10-2015-0059648, поданной 28 апреля 2015 года в Ведомство по интеллектуальной собственности республики Корея. Содержание вышеуказанной заявки включено посредством ссылки во всей их полноте.

Настоящее изобретение относится к пептиду с активностью, препятствующей ожирению и диабету, и его применению.

Предпосылки создания изобретения

В Корее потребление жира с пищей увеличивалось в последнее время с ростом экономики и вестернизацией диетических привычек, и возникновение метаболических заболеваний, таких как ожирение, диабет, гиперлипидемия, гипертония, атеросклероз и жировая инфильтрация печени, увеличилось из-за недостаточной физической нагрузки. Кроме того, ожирение является эстетической проблемой для людей, которые обычно склонны в предпочтении к изящным типам тела, а также сопровождается различными нарушениями.

На сегодняшний день терапевтические средства против ожирения можно в основном разделить на лекарственные средства, которые действуют на центральную нервную систему с нарушением аппетита, и лекарственные средства, которые действуют на желудочно-кишечный тракт с ингибированием всасывания.

Лекарственные средства, действующие на центральную нервную систему, поступили в продажу как лекарственные средства против ожирения, которые действуют на серотонин (5-HT) в нервной системе, такие как фенфлурамин, дексфенфлурамин и т.п., на норадренергическую нервную систему, такие как эфедрин и кофеин, и как на серотонин, так и на норадренергическую нервную систему, такие как недавно разработанный сибутрамин, в соответствии с классификацией по механизмам действия. Представителем лекарственных средств против ожирения, действующих на желудочно-кишечный тракт, является орлистат, разрешенный в качестве терапевтического средства для лечения ожирения, который ингибирует кишечную липазу с уменьшением поглощения жира.

Существуют проблемы с некоторыми из уже существующих лекарственных средств. Например, продажа фенфлурамина и т.п. была запрещена из-за побочного эффекта перехода к первичной легочной гипертензии или пороку сердца, а другие лекарственные средства нельзя применять для пациентов с сердечной недостаточностью или почечной недостаточностью вследствие возникновения снижения артериального давления или лактоцитоза.

Диабет является группой метаболических нарушений, вызываемых недостаточной секрецией инсулина или недостаточным нормальным функционированием (DeFronzo, 1988), и характеризуется гипергликемией, то есть высокими уровнями сахара в крови на протяжении длительного периода, которая является причиной различных симптомов и синдромов, вместе с глюкозой в моче. В последние годы заболеваемость ожирением, особенно абдоминальным ожирением, увеличилась, что привело к взрыву заболеваемости диабетом.

По состоянию на 2000 год число пациентов с диабетом по оценкам составило 170 млн во всем мире и, как ожидается, увеличится до 370 млн человек в 2030 году. Однако в аналитическом отчете за 2008 было указано, что число пациентов с диабетом, возможно, уже достигло 350 млн во всем мире (Danaei et al., 2011), что намного хуже, чем ожидалось. Сообщается, что более приблизительно 80% пациентов с диабетом типа 1 страдают ожирением, тогда как лишь менее 10% пациентов, не страдающих ожирением, имеют диабет (Harris et al., 1987). Корреляция между диабетом и ожирением объясняется тем, что адипокины и свободные жирные кислоты секретируются нерегулярно с вызовом накопления жирных кислот в чувствительных к инсулину тканях, таких как бета-клетки, почки, печень, сердце и т.д., что приводит к липотоксичности. При оставлении без подходящего лечения хроническая гипергликемия может иметь тенденцию к переходу в различные патологические симптомы, включающие ретинопатию, почечную дисфункцию, нейропатию и сосудистое нарушение. Эффективное контролирование сахара в крови необходимо для предупреждения таких осложнений.

В наше время контролирование уровней сахара в крови достигается коррекцией образа жизни (с помощью диетотерапии, лечебной физкультуры) и с помощью лекарственных средств. Однако строгое контролирование и выполнение диетотерапии и лечебной физкультуры затруднены, и в их результатах имеются ограничения. Поэтому большинство пациентов с диабетом полагаются на контролирование уровней сахара в крови с помощью лекарственных средств, таких как инсулин, стимуляторы секреции инсулина, усилители чувствительности рецепторов к инсулину и гипогликемические средства, а также коррекцию образа жизни.

Инсулин, продуцированный рекомбинантным способом, используется в качестве лекарственного средства, незаменимого для пациентов с диабетом типа 1 и пациентов с диабетом типа 2, которые не в состоянии контролировать уровни сахара в крови, и является полезным для контролирования сахара в крови. Однако они страдают от недостатка отталкивания игл для шприцов, трудности введения, риска гипогликемии и набора веса.

Меглитиниды, тип стимуляторов секреции инсулина, представляют собой средства короткого действия и принимаются перед едой. Среди них находятся NovoNorm (репаглинид), Fastic (натеглинид) и Glufast (митиглинид). Усилители чувствительности рецепторов к инсулину характеризуются почти от-

сутствием перехода к гипергликемии при приеме в виде монотерапии, и их примерами являются лекарственные средства бигуаниды, такие как метформин, и лекарственные средства тиазолидиндионы, такие как Avandia (розиглитазон) и Actos (пиоглитазон).

Агонисты GLP-1 были недавно разработаны с использованием действия глюкагоноподобного пептида-1, который является стимулирующим секрецию инсулина гормоном, и включают эксенатид и Victoza (лираглутид). Кроме того, ингибиторы DPP-4, которые ингибируют действие DPP-4 (дипептидилпептидазы-4), фермента, ответственного за быструю инактивацию GLP-1, являются недавно разработанными лекарственными средствами, и их типичным представителем является Januvia (название ингредиента: ситаглиптин). Однако, как сообщается, эти лекарственные средства имеют побочные эффекты, такие как гепатотоксичность, желудочно-кишечные расстройства, сердечно-сосудистые заболевания и канцерогенность. Другой проблемой с этими лекарственными средствами является высокая ежегодная стоимость лечения, что является препятствием на пути лечения диабета. В самом деле, затраты здравоохранения на преддиабет и диабет достигли приблизительно 200 трлн вон в США по состоянию на 2007 год (Dall et al., 2010) и затраты здравоохранения на ожирение также близки к 150 трлн вон в США по состоянию на 2008 году (Finkelstein et al., 2009). Следовательно, существует острая необходимость в разработке лекарственного средства, которое может эффективно снижать уровни глюкозы в крови и которое может использоваться для лечения и диабета, и вызванного ожирением диабета с меньшим количеством побочных эффектов.

Поэтому авторы настоящего изобретения недавно обратили внимание на механизм регулирования энергетического обмена, чтобы найти улучшенный способ лечения ожирения, и провели исследование сигналов, ответственных за накопление липидов, и белков, оказывающих влияние на накопление липидов при приеме пищи с высоким содержанием жира у людей, с замыслом, что соединение, которое должно быть разработано, будет обладать большей безопасностью (меньшей токсичностью). В результате исследования сигналов для подавления экспрессии белков, ответственных за накопление жира и за расщепление накопленного жира, и белков, участвующих в передаче сигналов, авторам настоящего изобретения удалось разработать пептиды, активирующие липолиз. Кроме того, пептиды настоящего изобретения демонстрируют исключительную терапевтическую эффективность при диабете и вызванном ожирением диабете. Накопление жира, вызванное диетами с высоким содержанием жира, подавление передачи сигнала от инсулина, объясняемое накоплением жира в печени или мышце, и результирующая инсулинорезистентность являются причинами диабета. Каждый из пептидов в соответствии с настоящим изобретением и их комплексы являются терапевтически эффективными в случае такого диабета и вызванного ожирением диабета.

На всем протяжении этого описания ссылаются на множество документов и патентных документов, с указанными ссылками в них. Раскрытия приведенных документов и патентных документов полностью включены сюда посредством ссылок, и, таким образом, точнее объясняется уровень техники, к которому относится настоящее изобретение, и содержание настоящего изобретения.

Подробное описание настоящего изобретения

Техническая проблема

Завершающееся настоящим изобретением интенсивное и тщательное исследование по разработке большого количества исключительных пептидов, обладающих биологически эффективной активностью, которое было проведено авторами настоящего изобретения, привело к обнаружению того, что пептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-7, действуют не только против ожирения, ингибируя накопление жира, вызванное диетами с высоким содержанием жира, и расщепляя уже накопленный жир, но также проявляют терапевтические эффекты на высоком уровне при диабете и вызванном ожирением диабете и осложнениях диабета.

Соответственно целью настоящего изобретения является предоставление пептидов, имеющих аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1-7.

Другой целью настоящего изобретения является создание пептида, обладающего препятствующей ожирению или противодиабетической активностью.

Следующей целью настоящего изобретения является предоставление пептидного комплекса, обладающего препятствующей ожирению или противодиабетической активностью.

Более того, целью настоящего изобретения является предоставление фармацевтической композиции для профилактики или лечения ожирения.

Еще одной целью настоящего изобретения является предоставление фармацевтической композиции для профилактики или лечения диабета.

Другие цели и преимущества настоящего изобретения поясняются последующим подробным описанием настоящего изобретения, формулой изобретения и чертежами.

Техническое решение

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения предоставляется пептид с активностью, препятствующей ожирению и диабету, имеющий аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-7.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения предлагается пептидный комплекс с активностью, препятствующей ожирению и диабету, состоящий из следующей комбина-

ции пептидов:

- (a) пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- (b) пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3; и
- (c) пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В результате предпринятых авторами настоящего изобретения усилий по разработке большого количества исключительных пептидов, обладающих биологически эффективной активностью, было обнаружено, что пептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-7, подавляют накопление жира, вызванное диетами с высоким содержанием жира, и расщепляют уже накопленный жир, таким образом, демонстрируя препятствующее ожирению действие и терапевтический эффект при диабете и вызванном ожирением диабете и осложнениях диабета.

Используемый здесь термин "пептид" относится к линейной молекуле из аминокислотных остатков, связанных пептидными связями. Пептиды настоящего изобретения могут быть получены с помощью способов химического синтеза, известных в данной области, в особенности методов твердофазного синтеза (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) или метода жидкофазного синтеза (патент США с № 5516891).

Пептиды настоящего изобретения могут быть модифицированы на N-конце или C-конце для выбора частей их аминокислотной последовательности и увеличения их активности. Благодаря такой модификации пептиды настоящего изобретения могут быть наделены пролонгированным периодом существования после *in vivo* введения.

Кроме того, C-концы пептидов настоящего изобретения могут быть модифицированы с использованием гидроксильной группы (-OH), аминогруппы (-NH₂), азидной группы (-NHNH₂) и т.д., тогда как N-концы могут быть связаны с защитным радикалом, состоящим из группы, состоящей из ацетила, флуоренилметоксикарбонила, формила, пальмитоила, миристила, стеарила и полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Благодаря вышеупомянутой аминокислотной модификации стабильность пептидов настоящего изобретения может быть значительно увеличена. Используемый здесь термин "стабильность", как предполагается, относится как к *in vivo* стабильности, так и к стабильности при хранении (например, стабильности во время хранения при комнатной температуре). Защитная группа действует для защиты пептидов настоящего изобретения от воздействия протеиназ *in vivo*.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения пептиды настоящего изобретения проявляют эффект подавления накопления жира, вызванного диетами с высоким содержанием жира, и расщепления уже накопленного жира, уменьшают экспрессию маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2, увеличивает экспрессию липолитических факторов pHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL, уменьшают размер адипоцитов (липоцитов) и понижают уровни холестерина в крови. Эти результаты свидетельствуют о том, что пептиды настоящего изобретения оказывают превосходные терапевтические эффекты при ожирении, диабете и вызванном ожирением диабете.

Не только отдельные пептиды с SEQ ID NO: 1-7, но также их комплекс проявляет превосходную препятствующую ожирению и противодиабетическую активность.

В соответствии с настоящим изобретением предложены пептиды с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов pHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения пептидный комплекс, проявляющий активность, препятствующую ожирению или диабету, включает следующую комбинацию пептидов: (a) пептид с SEQ ID NO: 1; (b) пептид с SEQ ID NO: 3; (c) пептид с SEQ ID NO: 6 или 7.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения пептидный комплекс настоящего изобретения состоит из пептидов, имеющих соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 3 и 7.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая пептид или пептидный комплекс настоящего изобретения в качестве эффективного ингредиента, для профилактики или лечения ожирения.

Превосходный с точки зрения функции ингибирования липогенеза и липолитической функции, пептид или пептидный комплекс настоящего изобретения может быть полезен для профилактики или лечения ожирения.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предоставляется фармацевтическая композиция, содержащая пептид или пептидный комплекс настоящего изобретения в качестве эффективного ингредиента, для профилактики или лечения диабета.

Действуя с вызовом эффективного снижения повышенного уровня сахара в крови на модели диабета на животном, пептид или пептидный комплекс настоящего изобретения может найти применение в профилактике или лечении диабета.

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения

композиция настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую (а) фармацевтически эффективное количество пептида или пептидного комплекса настоящего изобретения; (b) фармацевтически приемлемый носитель.

Используемый здесь термин "фармацевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения вышеуказанной эффективности или активности пептида.

Фармацевтически приемлемый носитель, содержащийся в фармацевтической композиции настоящего изобретения, может представлять собой носитель, который обычно используется при приготовлении лекарственных средств и включает, но без ограничения, лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмал, аравийскую камедь, карбонат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп, метилцеллюлозу, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло. Помимо этих ингредиентов, фармацевтическая композиция настоящего изобретения может, кроме того, содержать смазочное вещество, гигроскопическое вещество, подсластитель, корригент, эмульгатор, суспендирующий агент и консервант. Что касается фармацевтически приемлемых носителей и агентов, подходящих для использования, можно сослаться на Remington's Pharmaceutical Sciences (19-е изд., 1995).

Фармацевтическую композицию настоящего изобретения можно вводить перорально или парентерально. В случае парентерального введения могут использоваться внутримышечный, внутривенный, подкожный, внутривнутрибрюшинный, местный или чрескожный пути введения.

Доза фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением может меняться в зависимости от различных факторов, включающих лекарственную форму, способ введения, возраст, вес тела, пол, состояние здоровья пациента, диету, время введения, путь введения, скорость выведения, чувствительность и т.д. Например, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может вводиться в суточной дозе в диапазоне 0,0001-1000 мкг.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть приготовлена в формах на один прием или в упаковках на множество приемов, используя фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель в соответствии со способом, который может быть легко осуществлен специалистами в данной области техники. Здесь препаратом фармацевтической композиции может быть раствор, суспензия или эмульсия фармацевтической композиции в масле или водной среде или экстракт, порошок, гранула, таблетка или капсула, содержащая фармацевтическую композицию, и может дополнительно содержать диспергатор или стабилизатор.

Полезные эффекты

Признаки и преимущества настоящего изобретения суммированы следующим образом.

(i) Пептиды и пептидный комплекс настоящего изобретения проявляют не только эффект препятствования ожирению в результате подавления накопления жира и расщепления уже накопленного жира, но также исключительный терапевтический эффект при диабете в результате эффективного снижения уровней сахара в крови.

(ii) Пептиды и пептидный комплекс настоящего изобретения уменьшают экспрессию маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2, увеличивают экспрессию липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL, уменьшая, таким образом, размеры липоцитов и понижая уровни холестерина в крови.

(iii) Пептиды и пептидный комплекс настоящего изобретения обладают превосходной активностью и стабильностью и, таким образом, могут быть выгодно использованы в лекарственных средствах и препаратах общего воздействия.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены проанализированные с помощью окрашивания масляным красным O липиды, накопленные после обработки пептидом настоящего изобретения: (a) пептидом с SEQ ID NO: 1, (b) пептидом с SEQ ID NO: 3 и (c) пептидом с SEQ ID NO: 5.

На фиг. 2 представлены результаты накопления липидов после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения, в соответствии с анализом с помощью окрашивания масляным красным O.

На фиг. 3 представлены результаты измерения уровней экспрессии гена aP2, который участвует в липогенезе, после обработки пептидами настоящего изобретения: (A) пептидом с SEQ ID NO: 1, (B) пептидом с SEQ ID NO: 3 и (c) пептидом с SEQ ID NO: 5.

На фиг. 4 представлены результаты измерения уровней экспрессии генов PPAR γ , ACC и aP2, которые играют важную роль в липогенезе, после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения в различных концентрациях.

На фиг. 5 представлены результаты измерения уровней экспрессии PPAR γ и фосфо-HSL, которые играют важную роль в липогенезе, после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения в различных концентрациях.

На фиг. 6 представлены результаты измерения уровней экспрессии генов AMPK- α 1 и CGI-58, участвующих в расщеплении накопленных жиров, после обработки пептидами и пептидным комплексом настоящего изобретения: (A) пептидом с SEQ ID NO: 1, (B) пептидом с SEQ ID NO: 3, (C) пептидом с SEQ ID NO: 5 и (D) комплексом пептидов с SEQ ID NO: 1, 3 и 7.

На фиг. 7 представлены результаты измерения ATGL, белка, участвующего в расщеплении накопленных жиров, после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения в различных концентрациях.

На фиг. 8 представлены результаты измерения уровней экспрессии белка фосфо-HSL, участвующего в расщеплении накопленных жиров, после обработки пептидами настоящего изобретения: (а) пептидом с SEQ ID NO: 1, (b) пептидом с SEQ ID NO: 3, (c) пептидом с SEQ ID NO: 5 и (d) комплексом пептидов с SEQ ID NO: 1, 3 и 7, в соответствии с определением с использованием иммуноокрашивания.

На фиг. 9 представлены результаты измерения глицерина, продуцированного после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения в различных концентрациях.

На фиг. 10А представлены жировые ткани, подвергшиеся расщеплению, от экспериментальных моделей ожирения на мышах после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 10В представлены размеры и количество жировых тканей, подвергшихся расщеплению, от экспериментальных моделей ожирения на мышах после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 11 представлены результаты измерения уровней экспрессии белка фосфо-HSL, участвующего в расщеплении накопленных жиров, после обработки пептидным комплексом настоящего изобретения, в соответствии с определением с использованием иммуноокрашивания.

На фиг. 12 представлены изменения веса тела (г) и потребление пищи у страдающих ожирением мышей после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 13 представлены фотографии страдающих ожирением мышей после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 14 представлены результаты распределения жира в моделях ожирения на мышах, вызванного кормлением пищей с высоким содержанием жира, относительно экспериментальной модели на животном C57BL/6, в соответствии с определением с использованием иммуноокрашивания.

На фиг. 15 представлены фотографии жировых тканей, выделенных из моделей ожирения на мышах, вызванного кормлением пищей с высоким содержанием жира, относительно экспериментальной модели на животном C57BL/6, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 16А представлены морфологические визуализации адипоцитов в жировых тканях, взятых у моделей ожирения на мышах, вызванного кормлением пищей с высоким содержанием жира, относительно экспериментальной модели на животном C57BL/6, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 16В представлены результаты измерения размеров адипоцитов в жировых тканях, взятых у моделей ожирения на мышах, вызванного кормлением пищей с высоким содержанием жира, относительно экспериментальной модели на животном C57BL/6, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 17 представлены результаты измерения уровней экспрессии белка фосфо-HSL, участвующего в липолизе, в адипоцитах жировых тканей, взятых у моделей ожирения на мышах, вызванного кормлением пищей с высоким содержанием жира, относительно экспериментальной модели на животном C57BL/6, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 18 представлены результаты измерения уровней холестерина в образцах крови, взятых у моделей ожирения на мышах, вызванного кормлением пищей с высоким содержанием жира, относительно экспериментальной модели на животном C57BL/6, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 19 представлены результаты измерения уровней глюкозы в образцах крови, взятых у моделей ожирения на мышах, вызванного кормлением пищей с высоким содержанием жира, относительно экспериментальной модели на животном C57BL/6, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 20 представлены изменения уровня сахара в крови в модели на мыши, вызванного ожирением DB/DB, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 21 представлены изменения уровня холестерина в крови в модели на мыши, вызванного ожирением DB/DB, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

На фиг. 22 представлены изменения уровня сахара в крови в модели на мыши, вызванные ожирением DB/DB, после лечения пептидами настоящего изобретения: (А) пептидом с SEQ ID NO: 1, (В) пептидом с SEQ ID NO: 3 и (С) пептидом с SEQ ID NO: 5.

На фиг. 23 представлены результаты измерения уровней экспрессии IGF-1 и инсулина после обработки пептидом с SEQ ID NO: 7.

На фиг. 24 представлены изменения уровня сахара в крови в модели на мыши, вызванные ожирением DB/DB, после лечения пептидом с SEQ ID NO: 7.

На фиг. 25А-25D представлены изменения уровней сахара в крови у пациентов с диабетом, имеющих высокие уровни глюкозы в крови, после лечения пептидным комплексом настоящего изобретения.

Вариант осуществления настоящего изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Для специалистов со средним уровнем компетентности в данной области техники будет очевидно, что эти примеры предназначены лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не должны истолковываться как ограничение объема настоящего изобретения. Таким образом, существенный объем настоящего изобретения будет определяться прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Примеры

Пример синтеза 1. Синтез пептида.

В реактор с 700 мг хлортритилхлоридных смол (смол CTL, каталожный № Nova Biochem - 01-64-0021) добавляли 10 мл метиленхлорида (МС) и осуществляли перемешивание в течение 3 мин. После удаления растворителя добавляли 10 мл диметилформамида (DMF). Раствор снова перемешивали в течение 3 мин и затем растворитель удаляли. В реактор добавляли 10 мл раствора дихлорметана, а затем 200 ммоль Fmoc-Asn(Trt)-OH (Bachem, Швейцария) и 400 ммоль диизопропилэтиламина (DIEA). Реагенты полностью растворяли и реакцию осуществляли в реакцию при перемешивании в течение 1 ч. Впоследствии раствор промывали и осуществляли реакцию с раствором метанола и DIEA (2:1) в DCM (дихлорметане) в течение 10 мин. После промывки избыточным количеством DCM/DMF (1:1) растворитель удаляли. Затем добавляли 10 мл диметилформамида (DMF) с последующим перемешиванием в течение 3 мин. После удаления растворителя 10 мл раствора для удаления защиты (20% пиперидина/DMF) добавляли в реактор. Удалению растворителя предшествовало перемешивание в течение 10 мин при комнатной температуре. Раствор для удаления защиты добавляли в том же количестве, а затем через 10 мин удаляли из реакции. Дважды выполняли промывку с использованием DMF, один раз с использованием МС и один раз с использованием DMF, каждую промывку в течение 3 мин, с предоставлением Asn-CTL-смол. В другом реакторе 200 ммоль Fmoc-Arg(Pbf)-OH (Bachem, Швейцария), 200 ммоль HOBt и 200 ммоль BOP добавляли к 10 мл раствора DMF и полностью растворяли при перемешивании. В реактор добавляли 400 ммоль DIEA двумя аликвотами с последующим перемешиванием в течение по крайней мере 5 мин до полного растворения твердых веществ. В реактор, в который были помещены незащищенные смолы, вносили раствор смеси растворенных аминокислот, с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 1 ч для осуществления реакции. После удаления реакционного раствора перемешивание осуществляли трижды в течение 3 мин каждый раз, вместе с раствором DMF, который затем удаляли. Небольшое количество смол в ходе реакции отбирали и использовали в реакции Кайзера (нингидриновой реакции) для проверки степени завершенности реакции. Одну и ту же реакцию удаления защиты выполняли дважды с использованием раствора для удаления защиты с получением Arg-Asn-CTL смол. Смолы в достаточной степени промывали с использованием DMF и МС перед выполнением еще одной реакции Кайзера. Последующие эксперименты по присоединению аминокислот проводились так же, как описано выше. В соответствии с выбранной аминокислотной последовательностью реакции индуцировали последовательно с использованием Fmoc-Thr(tBU)-OH, Fmoc-Lys(Boe)-OH и Fmoc-Leu-OH в этом порядке. Fmoc-защитную группу удаляли с помощью проводимой дважды реакции с раствором для удаления защиты, каждую реакцию в течение 10 мин, а затем хорошей промывки. Уксусный ангидрид, DIEA и HOBt добавляли и подвергали ацетилированию в течение 1 ч. Полученные таким образом пептидные смолы промывали трижды каждым из DMF, МС и метанола. Смолы сушили медленно пропускаемым газообразным азотом, а затем подвергали полной сублимации в атмосфере P205. Смолы подвергали реакции в течение 2 ч при комнатной температуре с 30 мл остаточного раствора (81,5% трифторуксусной кислоты, 5% дистиллированной воды, 5% тиаизола, 5% фенола, 2,5% EDT и 1% TIS) при встряхивании время от времени. Смолы подвергали фильтрации и промывке небольшим объемом раствора TFA, после чего фильтрат объединяли с маточным раствором. После перегонки при пониженном давлении для уменьшения общего объема вдвое использовали 50 мл холодного эфира, чтобы индуцировать осаждения, и образованные таким образом осадки собирали с помощью центрифугирования и промывали дважды холодным эфиром. После удаления маточного раствора остаток сушили в достаточной степени в атмосфере азота с предоставлением 0,85 г неочищенного пептида с SEQ ID NO: 1 NH₂-Leu-Lys-Thr-Arg-Asn-COOH (с выходом: 92%). Был осуществлен синтез NH₂-Lys-Gly-Ala-Cys(Ser)-Thr-Gly-Trp-Met-Ala-COOH в количестве 0,78 г в качестве пептидов с SEQ ID NOS: 2 и 3 (с выходом 82%), NH₂-Ala-Cys(Ser)Thr-Leu-Pro-His-Pro-Trp-Phe-Cys(Ser)-COOH в количестве 0,92 г в качестве пептидов SEQ ID NOS: 4 и 5 (с выходом 85%) и NH₂-Cys (Ser)-Asp-Leu-Arg-Arg-Leu-Glu-Met-Tyr-Cys(Ser)-COOH в количестве 0,76 г в качестве пептидов с SEQ ID NOS: 6 и 7 (с выходом 88%). Было установлено, что пептиды с SEQ ID NO: 1, 2, 4 и 6 имеют молекулярные массы, равные 630,7 (теоретическое значение 630,7), 924,5 (теоретическое значение 924,1), 1236 (теоретическое значение 1236,5) и 1301,5 (теоретическое значение 1301,5) соответственно, как определено помощью масс-спектрометрии.

Таблица 1

Пептид	Аминокислотная последовательность	Анализ (масс-спектрометрия)	
		Определенное значение	Теоретическое значение
SEQ ID NO: 1		630,7	630,7
SEQ ID NO: 2	KGACTGWMA	924,5	924,1 (908,0)
SEQ ID NO: 3	KGASTGWMA		
SEQ ID NO: 4	ACYLPHPWFC	1236	1236,5 (1269,4)
SEQ ID NO: 5	ASYLPHPWFS		
SEQ ID NO: 6	CDLRRLEMYC	1301,5	1301,5
SEQ ID NO: 7	SDLRRLEMYS		

Между тем, пептиды с SEQ ID NO: 1, 3 и 7 в равных количествах смешивали с получением пептидного комплекса, эффективность которого оценивали.

Пример 1. Анализ активности ингибирования липогенеза.

1-1. Анализ подавления накопления липидов при использовании преадипоцита (окрашивание масляным красным О).

Клетки 3T3-L1, преадипоциты, выращивали до конфлюэнтного состояния, а затем инкубировали в течение двух дней с различными концентрациями пептидов в среде для дифференцировки, содержащей 10 мкг/мл инсулина, 0,1 мкМ дексаметазона и 0,5 мкМ IBMX. Среда заменяли средой, содержащей 10 мкг/мл инсулина, каждые 2 дня. После индукции дифференцировки в течение 10 дней формирование жировых включений (капель) в клетках проверяли с помощью окрашивания масляным красным О. Полученные адипоциты 3T3-L1 промывали PBS, фиксировали 3,7% формалином в течение 1 ч и промывали 60% изопропанолом. Получающиеся клетки окрашивали реагентом масляным красным О при комнатной температуре в течение 20 мин. После удаления реагента масляного красного О клетки трижды промывали дистиллированной водой и наблюдали под фазово-контрастным микроскопом. Для количественного анализа жиры экстрагировали из клеток, используя 100% изопропанол, клетки переносили в 96-луночные планшеты в количестве 200 мкл/луноку и оптическую плотность при 500 нм измеряли с помощью считывающего устройства для ELISA.

Экспериментальные данные свидетельствовали о том, что обработка пептидами с SEQ ID NO: 1, 3 и 5 уменьшала степени накопления жира в клетках, как определено с помощью окрашивания масляным красным О (фиг. 1А-С).

Степень накопления липидов в клетках также уменьшалась, когда комплекс пептидов с SEQ ID NO: 1, 3 и 7 применялся в разных концентрациях (фиг. 2).

1-2. Подавление экспрессии генов, участвующих в липогенезе.

Клетки 3T3-L1 (преадипоциты) засевали в 6-луночные планшеты с плотностью 3×10^5 клеток/луноку. После культивирования в течение 24 ч клетки инкубировали с пептидами в заданных концентрациях (0,1, 1 и 10 мкг/мл) в течение 14 дней в термостате с температурой 37°C. Впоследствии клетки собирали и обрабатывали раствором для экстракции РНК (Easy Blue, Intron) для приготовления РНК, исходя из которой затем синтезировали кДНК с использованием RT премикса (Intron). ПЦР проводили, используя праймеры для антигенных маркеров (PPAR γ , ACC и aP2) и премикс для ПЦР.

Последовательности мишень-специфических праймеров для ПЦР маркеров липогенеза были следующими: последовательность прямого праймера для PPAR γ , 5'-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3' и обратного праймера для PPAR γ , 5'-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3' (температура отжига, 60°C);

последовательность прямого праймера для ACC, 5'-ACCTTACTGCCATCCCATGTGCTA-3' и обратного праймера для ACC, 5'-GTGCCTGATGATCGCACGAACAAA-3' (температура отжига, 60°C);

последовательность прямого праймера для aP2, 5'-CATCAGCGTAAATGGGGATT-3' и обратного праймера для aP2, 5'-ACACATTCCACCACCAGCTT-3' (температура отжига, 60°C).

Каждый из ПЦР-продуктов загружали в объеме 5 мкл в 1% агарозный гель и подвергали электро-

форезу, с последующей идентификацией полос в Gel-Doc.

В линии клеток остеобластов мыши 3T3-L1, которую инкубировали с пептидом с SEQ ID NO: 1, 3 или 5 в течение трех дней, отмечали уменьшение уровней экспрессии маркера липогенеза $\alpha P2$ (фиг. 3A-C).

Также при инкубации в течение трех дней с составляющими 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл концентрациями комплекса пептидов с SEQ IS NO: 1, 3 и 7, в линии клеток остеобластов мыши отмечали уменьшение экспрессии маркеров липогенеза $PPAR\gamma$, ACC и $\alpha P2$, подобно клеткам, обработанным 100 нг/мл $TNF\alpha$, в качестве положительно контроля (фиг. 4).

1-3. Исследование экспрессии индуцирующих липогенез и липолиз белков при использовании преадипоцита.

Клетки 3T3-L1 (преадипоциты) засевали в 6-луночные планшеты с плотностью 3×10^5 клеток/луночку. После культивирования в течение 24 ч клетки инкубировали с пептидным комплексом в заданных концентрациях (0,1, 1 и 10 мкг/мл) в течение 14 дней в термостате с температурой 37°C. Клеточные лизаты, полученные путем обработки буфером для лизиса клеток, использовали для количественного определения белка, а затем Вестерн-блоттинга с использованием антитела против $PPAR\gamma$ (Santa Cruz Biotechnology, США), которое является антителом против маркера липогенеза, и антитела против $pHSL$ (Santa Cruz Biotechnology, США), которое является антителом против маркера липолиза.

При обработке пептидным комплексом в разных концентрациях в клетках наблюдали уменьшение экспрессии маркера липогенеза $PPAR\gamma$ дозозависимым образом при все увеличивающейся экспрессии маркера липолиза $pHSL$ (фиг. 5).

Пример 2. Оценка липолитической активности.

2. Увеличенная экспрессия генов, участвующих в липолизе.

Клетки 3T3-L1 (преадипоциты) засевали в 6-луночные планшеты с плотностью 3×10^5 клеток/луночку. После культивирования в течение 24 ч клетки инкубировали с пептидами в заданных концентрациях (0,1, 1 и 10 мкг/мл) в течение 14 дней в термостате с температурой 37°C (положительный контроль: 100 нг/мл $TNF\alpha$ (SIGMA)). Клетки собирали и обрабатывали раствором для экстракции РНК (Easy Blue, Intron) для приготовления РНК, исходя из которой затем синтезировали кДНК с использованием RT премикса (Intron). ПЦР проводили, используя праймеры для маркеров ($AMPK-\alpha 1$ и CGI58) и премикс для ПЦР.

Последовательности мишень-специфических праймеров для ПЦР маркеров липолиза были следующими: последовательность прямого праймера для $AMPK-\alpha 1$, TGACCGGACATAAAGTGGCTGTGA-3' и обратного праймера для $AMPK-\alpha 1$, 5'-TGATGATGTGAGGGTGCCTGAACA-3' (температура отжига, 60°C);

последовательность прямого праймера для CGI58, 5'-TGTGCAGGACTCTTACTTGGCAGT-3' и обратного праймера для CGI58, 5'-GTTTCTTTGGGCAGACCGGTTTCT-3' (температура отжига, 60°C).

Каждый из ПЦР-продуктов загружали в объеме 5 мкл в 1% агарозный гель и подвергали электрофорезу, с последующей идентификацией полос в Gel-Doc.

Во всех преадипоцитах (3T3-L1), которые инкубировали с пептидами, отмечали увеличенные уровни экспрессии маркеров липолиза $AMPK-\alpha 1$ и CGI-58 (фиг. 6A-C). Кроме того, обработка пептидным комплексом, как отмечали, приводила к увеличению экспрессии $AMPK-\alpha 1$ и CGI-58 дозозависимым образом и до более высоких уровней по сравнению с обработкой 100 нг/мл $TNF\alpha$ в качестве положительного контроля (фиг. 6D).

2-2. Исследование экспрессии индуцирующих липолиз белков при использовании преадипоцита.

Клетки 3T3-L1 (преадипоциты) засевали в 6-луночные планшеты с плотностью 3×10^5 клеток/луночку. После культивирования в течение 24 ч клетки инкубировали с пептидным комплексом в заданных концентрациях (0,1, 1 и 10 мкг/мл) в течение 14 дней в термостате с температурой 37°C (положительный контроль: 100 нг/мл $TNF\alpha$ (SIGMA)). Клеточные лизаты, полученные путем обработки буфером для лизиса клеток, использовали для количественного определения белка, а затем Вестерн-блоттинга с использованием антитела против ATGL (Santa Cruz Biotechnology, США), которое является антителом против маркера липолиза.

При обработке пептидным комплексом экспрессия маркера липолиза ATGL уменьшалась (фиг. 7).

2-3. Исследование с помощью флуоресцентной микроскопии экспрессии индуцирующего липолиз белка при использовании преадипоцита.

Клетки 3T3-L1 (преадипоциты) засевали в 6-луночные планшеты с плотностью 3×10^5 клеток/луночку. После культивирования в течение 24 ч клетки инкубировали с отдельными пептидами или пептидным комплексом (1 мкг/мл) в течение 14 дней в термостате с температурой 37°C (положительный контроль: 100 нг/мл $TNF\alpha$ (SIGMA)). Впоследствии клетки фиксировали с использованием 70% этанола, а затем подвергали иммуноокрашиванию антителом против фосфо-HSL (Santa Cruz Biotechnology, США) для исследования экспрессии в клетках фосфо-HSL, маркера липолиза.

Исходя из экспериментальных данных, и пептиды в отдельности (фиг. 8A-C), и пептидный комплекс (фиг. 8D), как отмечалось, приводили к увеличению экспрессии маркера липолиза фосфо-HSL.

2-4. Количественный анализ глицерина, продукта липолиза.

После взятия жировых тканей из живота мышей с вызванным ожирением, их помещали в 24-

луночные планшеты для культивирования с плотностью 100 мг/лунку и культивировали в среде для культивирования (1 мл буфера Кребса-Рингера, содержащего 25 мМ HEPES, 5,5 мМ глюкозы и 2% (в отношении веса к объему) бычьего сывороточного альбумина). При этом ткани инкубировали в течение 48 ч с 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл пептидного комплекса, тогда как 100 нг/мл TNF α использовали в качестве положительного контроля. Глицерин, образуемый во время липолиза, подвергали количественному анализу.

Как это понятно из экспериментальных данных, количество глицерина, являющегося результатом липолиза при обработке пептидным комплексом, увеличивалось дозозависимым образом и превысило количества глицерина, образованного при обработке положительным контролем TNF α (фиг. 9).

2-5. Эффект лизиса жировой ткани, выделенной из страдающей ожирением мыши.

Жировые ткани подразделяются на белый жир и бурый жир в зависимости от цвета и на подкожный жир, брюшной жир, брыжеечный жир (висцеральный жир) и эпидидимальный жир классифицируются в зависимости от ткани. После анатомирования тела выполняли липэктомии на тканях. Белый жир выделяли, помещали в 24-луночные планшеты в количестве 100 мг/лунку, а затем инкубировали в течение 72 ч с различными концентрациями пептидного комплекса в среде для культивирования (1 мл буфера Кребса-Рингера, содержащего 25 мМ HEPES, 5,5 мМ глюкозы и 2% (в отношении веса к объему) бычьего сывороточного альбумина). Делали срезы жировых тканей, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Размеры адипоцитов сравнивали под микроскопом (TS100, Nikon) с 100-кратным увеличением.

По сравнению с контролем в жировых тканях, обработанных различными концентрациями пептидов, адипоциты были меньшего размера (фиг. 10A). Кроме того, при определении размера клеток с помощью программы жировые ткани, имеющие отличные клеточно-мембранные компартменты, наблюдались после обработки пептидным комплексом (фиг. 10B).

2-6. Исследование липолитического маркера в жировой ткани.

Жировую ткань, взятую из живота мыши с вызванным ожирением, помещали в количестве 100 мг/лунку в 24-луночные планшеты и инкубировали в течение 48 ч с пептидным комплексом, в то время как 100 нг/мл TNF α использовали в качестве положительного контроля. Детектировали меченый маркер липолиза фосфо-HSL (зеленый флуоресцентный материал).

Отмечали, что обработка пептидным комплексом приводит к увеличению уровня экспрессии маркера липолиза фосфо-HSL в жировых тканях (фиг. 11).

Пример 3. Эффект подавления липогенеза и активирования липолиза у экспериментального животного.

Потеря веса и подавление липогенеза у животного, которого кормили пищей с высоким содержанием жира.

Модели DIO (вызванного диетами ожирения), которые стали страдать ожирением в результате их кормления пищей с высоким содержанием жира, использовались для экспериментов по препятствованию ожирению, в которых 5 мкг/мл TNF α использовали в качестве положительного контроля. В качестве контроля кормили обычной пищей, а не пищей с высоким содержанием жира. В этом эксперименте пищей с высоким содержанием жира кормили в течение 12 недель, пока применялся пептидный комплекс или положительный контроль. Во время эксперимента контролировали вес тела.

TNF α и соединения против ожирения вводили внутрибрюшинно в 3-4 ч после полудня каждую неделю в течение 12 недель. Вес тела и количество пищи измеряли непосредственно перед первым введением, а затем регулярно с интервалами в одну неделю. Образцы крови отбирали из хвостовой вены после экспериментов по введению лекарственного средства, и уровни сахара в крови измеряли, используя Accu-Check Active (Roche), а уровни холестерина анализировали, используя набор Cholesterol calculation Kit (BioVision). Жировые ткани подразделяются на белый жир и бурый жир в зависимости от цвета и на подкожный жир, брюшной жир, брыжеечный жир (висцеральный жир) и эпидидимальный жир классифицируются в зависимости от ткани. После липэктомии исследовали жиры, полученные таким образом из тканей. Для гистологического исследования, жиры фиксировали с использованием 10% нейтрального забуференного формалина, заделывали в парафиновые блоки, делали срезы толщиной 5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Для анализа фосфорилирования маркера липолиза HSL выполняли флуоресцентное окрашивание с использованием антитела против pHSL. Образец ткани готовили, заключали в среду для заключения ткани глицериновый гель и покрывали покровным стеклом. Ткани исследовали под микроскопом (Nikon, TS100), со встроенной цифровой камерой, делающей их снимки.

В течение 12 недель от первоначальной стадии до конечной стадии эксперимента вес мышей, как определено, увеличивался с 20,9 до 28,74 г, когда кормили обычной пищей, и с 20,99 до 49,5 г, когда кормили пищей с высоким содержанием жира. У мышей, которые получали пищу с высоким содержанием жира плюс введения пептидного комплекса, привес достигал лишь 36,76 г через 12 недель от первоначального веса, составляющего 21,1 г, что указывает на значительное уменьшение привеса (174,2%), по сравнению с контрольной группой, которую кормили пищей с высоким содержанием жира (235,8%) (табл. 2 и фиг. 12).

Таблица 2. Вес модели ожирения на мыши после лечения пептидным комплексом
Вес (г)

	Обычная пища (контроль)	Пища с высоким содержанием жира	Пища с высоким содержанием жира+пептид/конт роль	Пища с высоким содержанием жира+пептидны й комплекс
0 недель	20,09	20,99	22,41	21,1
1 неделя	20,75	22,32	23	21,26
2 недели	21,99	25,25	26,12	23,72
3 недели	18,23	27,35	27,45	24,36
4 недели	23,26	30,2	30,51	25,29
5 недель	23,16	32,76	32,76	28,65
6 недель	23,28	36,78	33,49	28,79
7 недель	24,71	38,31	35,14	30,37
8 недель	25,84	40,12	37,15	31,53
9 недель	25,59	42,14	38,97	32,59
10 недель	28,13	43,02	40,39	33,78
11 недель	27,9	45,7	41,35	35,33
12 недель	28,74	49,5	43,91	36,76

Вес (%)

	Обычная пища (контроль)	Пища с высоким содержанием жира	Пища с высоким содержанием жира+пептид/конт роль	Пища с высоким содержанием жира+пептидны й комплекс
0 недель	100	100	100	100
1 неделя	100,3	106,3	102,6	100,8
2 недели	109,5	120,3	116,6	112,4
3 недели	90,7	130,3	122,5	115,5
4 недели	115,8	143,9	136,1	119,9
5 недель	115,3	156,1	146,2	135,8
6 недель	115,9	175,2	149,4	136,4
7 недель	123,0	182,5	156,8	143,9
8 недель	128,6	191,1	165,8	149,4
9 недель	127,4	200,8	173,9	154,5
10 недель	140,0	205,0	180,2	160,1
11 недель	138,9	217,7	184,5	167,4
12 недель	143,1	235,8	195,9	174,2

Кроме того, по завершении 12-недельного эксперимента отмечалось, что у подвергнутых лечению пептидным комплексом мышей сохранялись размеры их тел, аналогичные тем, которые были характерны для нормальных мышей (обычная пища), но не для мышей, которых кормили пищей с высоким содержанием жира, в соответствии с анализом фотографий (фиг. 13).

Спустя 12 недель эксперимента мышей подвергали микро-КТ для определения распределения жира по всему телу. В результате полученных с помощью микро-КТ данных о жирах (желтых) в теле, уровень жиров, распределенных по всему телу, заметно увеличивался у мышей, которых кормили пищей с высоким содержанием жира, по сравнению с контрольной группой, которую кормили обычной пищей, в то время значительно уменьшенный уровень жиров, распределенных по всему телу, отмечался в группе,

получавшей лечение пептидным комплексом плюс пищу с высоким содержанием жира (фиг. 14).

Мышей, которые завершили микро-КТ-визуализацию, анатомировали для выделения жировых тканей, распределенных по всему телу. Сравнивали объемы жировых тканей. В результате объем жира, выделенного у мышей, которых кормили пищей с высоким содержанием жира, превышал таковой у мышей, которых кормили обычной пищей, со значительным снижением объема жира у мышей, получавших лечение пептидным комплексом плюс пищу с высоким содержанием жира (фиг. 15).

Жиры выделяли и окрашивали Н&Е для визуализации размеров жировых клеток. Меньшие размеры жировых клеток наблюдались у мышей, получавших как пищу с высоким содержанием жира, так и пептидный комплекс, чем в контрольной группе, которую кормили пищей с высоким содержанием жира (фиг. 16А). Анализ размера адипоцита по программе показал, что в случае допущения, что размер адипоцита в контрольной группе, которую кормили обычной пищей, составляет 100%, размер адипоцита увеличивается до 127% в группе, которую кормили пищей с высоким содержанием жира, но снижается до 97% в группе, получавшей пищу с высоким содержанием жира и пептидный комплекс (фиг. 16В).

Жиры выделяли и исследовали на уровень экспрессии маркера липолиза фосфо-HSL в жировых тканях. Было обнаружено, что мыши, получавшие как пищу с высоким содержанием жиров, так и пептидный комплекс, имели повышенный уровень экспрессии фосфо-HSL (фиг. 17).

Уровни холестерина в крови у мышей после эксперимента были измерены. В результате уровень холестерина в крови составлял 2,52 мкг/мл у мышей, которых кормили обычной пищей, 3,5 мкг/мл у мышей, которых кормили пищей с высоким содержанием жира, и 2,86 мкг/мл у мышей, получавших как пищу с высоким содержанием жиров, так и пептидный комплекс, что указывает на то, что пептидный комплекс снижает уровень холестерина, который повышался вместе с ожирением (фиг. 18).

Уровни сахара в крови после завершения эксперимента составляли 174 мг/дл у мышей, которых кормили обычной пищей, и увеличивались до 235 мг/дл у мышей, которых кормили пищей с высоким содержанием жира. Тем не менее, было определено, что уровень сахара в крови у мышей, получавших как пищу с высоким содержанием жиров, так и пептидный комплекс, составляет 183 мг/дл, его значительное снижение (фиг. 19).

Пример 4. Контролирование уровня сахара в крови.

Эффект на контролирование сахара в крови.

В этом эксперименте с животными использовали C57BL/6 (нормальную мышь, приобретенную у Samtako Inc.) и самку C57BLKS/JLepr (модель диабета на мыши, мышь db/db, приобретенную в Центральной лаборатории Animal Inc.) вместе с пептидным комплексом в качестве эффективного против диабета и/или ожирения материала и ситаглиптином в качестве положительного контрольного лекарственного средства. В этом примере комплекс, эффективный против диабета и/или ожирения, оценивали на предмет сильной противодиабетической эффективности (однократное введение) на модели нормальной мыши и на модели генетически предрасположенного диабета, используя тест GTT (тест на толерантность к глюкозе), который является типичным способом диагностики диабета. Мышей выращивали в клетке при температуре 22-24°C и относительной влажности 50-30%, с четырьмя мышами в каждой клетке. Мыши находились при свете 150-300 люкс с 8 ч утра до 8 ч вечера с использованием цикла 12 ч свет/12 ч темнота. Им был предоставлен свободный доступ к обычной пище (18% белка, произведенной в 2018 году, Harlan Laboratories Inc, США). Сначала мыши голодали в течение 4 ч или дольше перед GTT-экспериментом (анализом в зависимости от назначенного лечения) и в течение 12 ч до GTT-эксперимента. Комплекс вводили перорально принудительно с помощью одноразового шприца для перорального введения за один час до GTT-эксперимента. Для GTT-эксперимента мышам разрешался свободный доступ к пище с высоким содержанием жира в 0 (нуль) ч после начала эксперимента. Через 40 мин свободного доступа к пище с высоким содержанием жира образцы крови для использования в исследовании уровня глюкозы в крови брали из хвостовой вены с интервалами 0, 30, 60, 90, 120 и 180 мин. Уровни глюкозы в крови измеряли, используя Accu-Chek Active (Roche). Ситаглиптин, используемый в качестве терапевтического средства для лечения диабета, был выбран в качестве положительного контрольного лекарственного средства и вводился в дозе 100 мг/кг. Комплекс, выбранный как эффективный кандидат против диабета и/или ожирения, вводился в дозе 100 мг/кг экспериментальным группам из четырех мышей.

В результате пептидный комплекс проявлял редуцирующий эффект на уровни сахара в крови, при этом уровень сахара в крови, повышенный с помощью пищи с высоким содержанием жира, снижался в результате лечения пептидным комплексом. В моделях вызванного диабета на мышах уровень сахара в крови снижался с помощью комплекса (фиг. 20А и В). Кроме того, были обнаружены более низкие уровни холестерина в крови в группе, получавшей как пищу с высоким содержанием жиров, так и пептидный комплекс, чем в контрольной группе, которую кормили пищей с высоким содержанием жира (фиг. 21).

Кроме того, после голодания в течение 16 ч мышей с вызванным диабетом DB/DB кормили в течение 30 мин, а затем им вводили пептиды. Уровни сахара в крови измеряли в динамике по времени.

Было обнаружено, что уровни сахара в крови в группах, соответственно подвергнутых лечению пептидами с SEQ ID NO: 1, 3 и 5, уменьшаются зависящим от времени образом (фиг. 22А-С).

Пример 5. Активация экспрессии инсулина и инсулиноподобного фактора роста.

Активация экспрессии инсулина и инсулиноподобного фактора роста.

Клетки 3T3-L1 (преадипоциты) засеивали в 6-луночные планшеты с плотностью 3×10^5 клеток/лунку и выращивали в течение 24 ч. Впоследствии клетки инкубировали с пептидами в различных концентрациях (10 нг - 1 мкг/мл) в течение 14 дней в термостате с температурой 37°C. Белки выделяли из клеточных лизатов, которые были получены путем обработки буфером для лизиса клеток, подвергали количественному анализу и Вестерн-блоттингу, используя антитело против IGF-1, которое является антителом против маркера липолиза, и антитело против инсулина (Santa Cruz Biotechnology, США).

Исходя из этих данных было установлено, что пептид с SEQ ID NO: 7 увеличивал экспрессию IGF-1 и инсулина дозозависимым образом (фиг. 23).

Пример 6. Наблюдение эффекта снижения уровня сахара в крови в клиническом эксперименте.

Снижение уровня сахара в крови за счет приема комплекса.

Был проведен краткий клинический тест для лиц в возрасте 45-65 лет, у которых уровень глюкозы в крови натощак составлял 170 мг/дл или выше. Через 30 мин после приемов пищи они принимали препарат комплекса. У людей брали образцы крови с интервалами 30, 60, 90, 120, 150 и 180 мин и измеряли уровень глюкозы, используя Accu-Chek Active (Roche).

Снижение уровня сахара в крови с помощью препарата комплекса наблюдалось у всех испытуемых (фиг. 25A-D).

Хотя настоящее изобретение было подробно описано со ссылкой на конкретные признаки, специалистам в данной области техники будет очевидно, что это описание предназначается лишь для предпочтительного варианта осуществления и не ограничивает объем настоящего изобретения. Таким образом, существенный объем настоящего изобретения будет определяться прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

2. Пептид с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

3. Пептид с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

4. Пептид с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

5. Пептид с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

6. Пептид с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

7. Пептид с активностью, препятствующей ожирению или диабету, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, для уменьшения экспрессии маркеров липогенеза PPAR γ , ACC и aP2 или увеличения экспрессии липолитических факторов rHSL, AMPK- α 1, CGI-58 и ATGL.

8. Пептид по любому из пп.1-7, подавляющий липогенез.

9. Пептид по любому из пп.1-7, уменьшающий экспрессию PPAR γ (гамма-рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором), ACC (ацетил-КоА-карбоксилазы) или aP2 (адипоцитарного белка, связывающего жирные кислоты).

10. Пептид по любому из пп.1-7, активирующий липолиз.

11. Пептид по любому из пп.1-7, увеличивающий экспрессию rHSL (фосфорилированной гормончувствительной липазы), AMPK- α 1 (АМФ-активируемой протеинкиназы α 1), CGI-58 (белка сравнительной геномной идентификации-58) или ATGL (триглицеридлипазы жировой ткани).

12. Пептид по любому из пп.1-7, снижающий уровень сахара в крови.

13. Пептидный комплекс, проявляющий активность, препятствующую ожирению или диабету, и включающий следующую комбинацию пептидов:

(a) пептид с SEQ ID NO: 1;

(b) пептид с SEQ ID NO: 3;

(c) пептид с SEQ ID NO: 6 или 7.

14. Пептидный комплекс по п.13, уменьшающий размеры адипоцитов.

15. Пептидный комплекс по п.13, снижающий уровень холестерина в крови.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп.1-12 в качестве эффективного ингредиента, для профилактики или лечения ожирения.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая пептидный комплекс по любому из пп.13-15 в качестве эффективного ингредиента, для профилактики или лечения ожирения.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп.1-12 в качестве эффективного ингредиента, для профилактики или лечения диабета.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая пептидный комплекс по любому из пп.13-15 в качестве эффективного ингредиента, для профилактики или лечения диабета.

20. Способ профилактики или лечения ожирения или диабета, включающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества пептида по любому из пп.1-12.

21. Способ профилактики или лечения ожирения или диабета, включающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества пептидного комплекса по любому из пп.13-15.



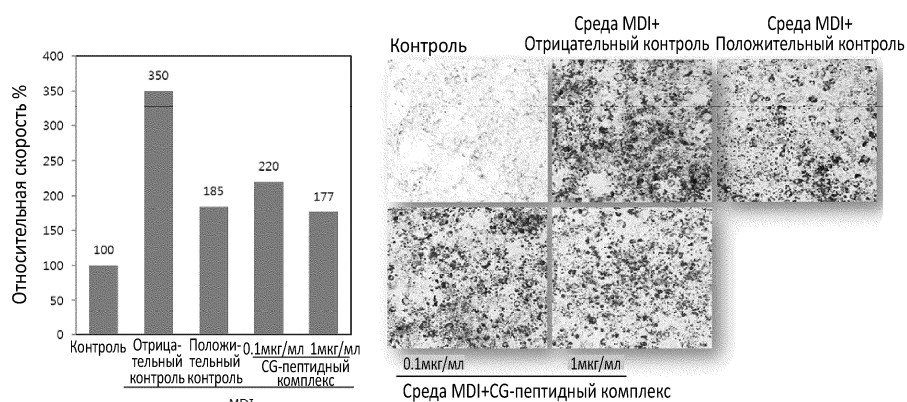
Фиг. 1А



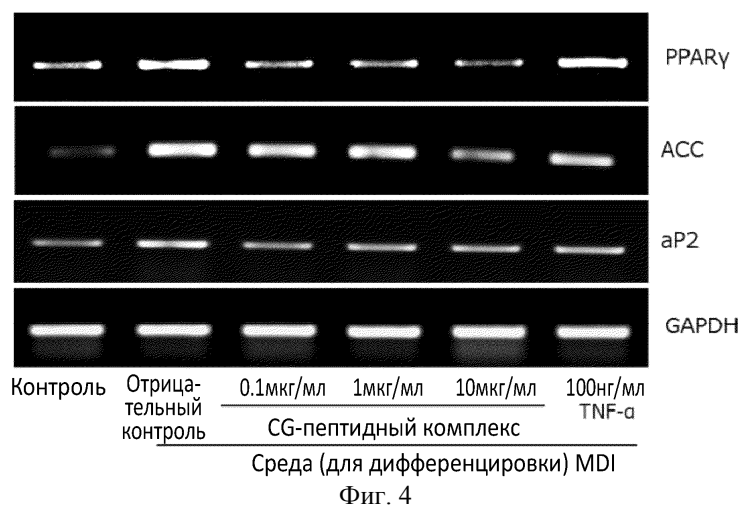
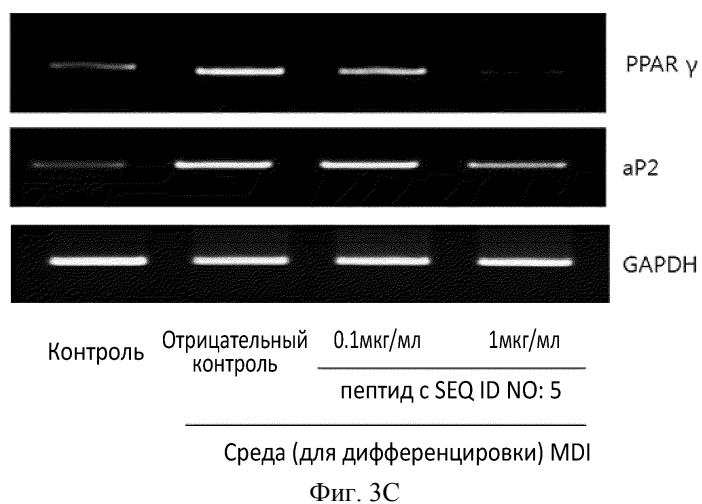
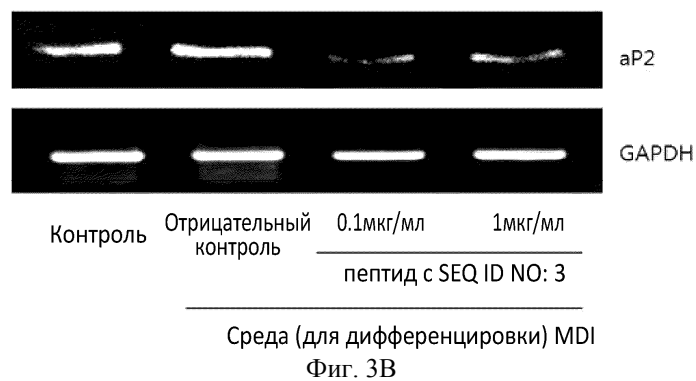
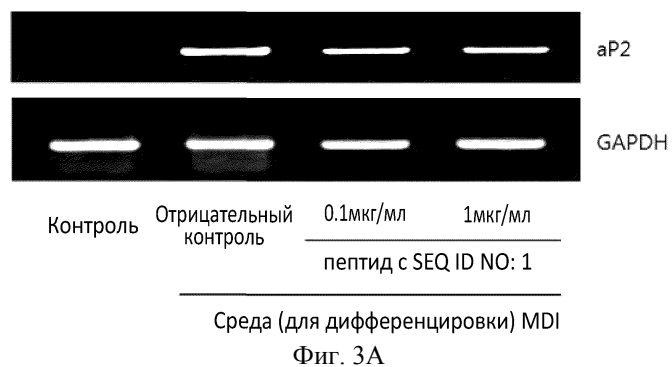
Фиг. 1В

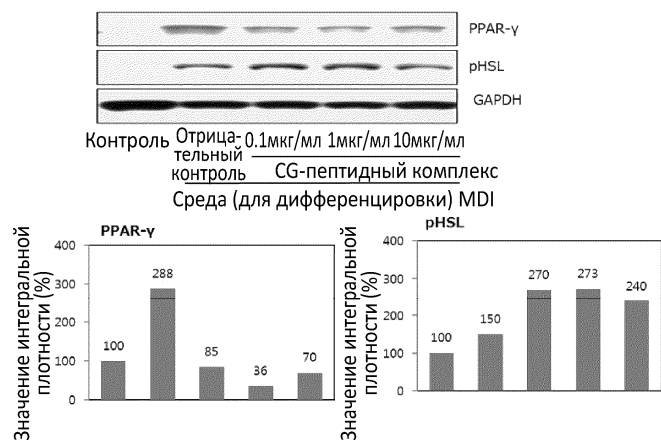


Фиг. 1С

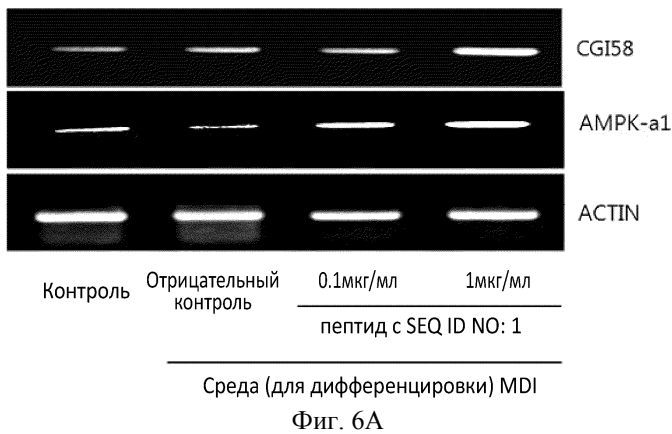


Фиг. 2

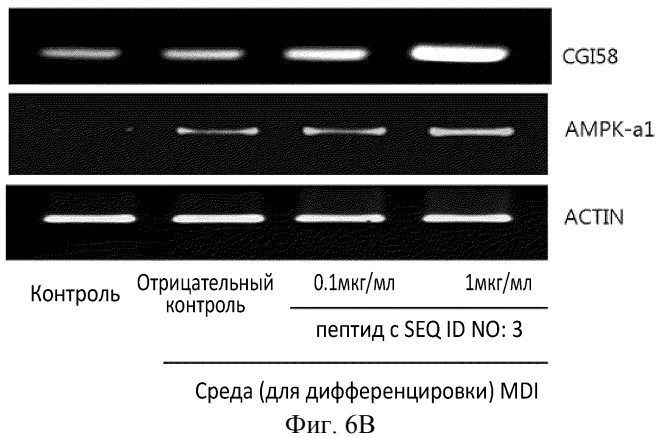




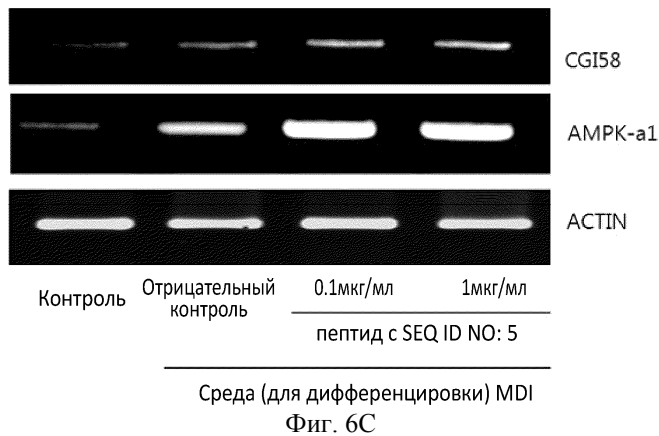
Фиг. 5



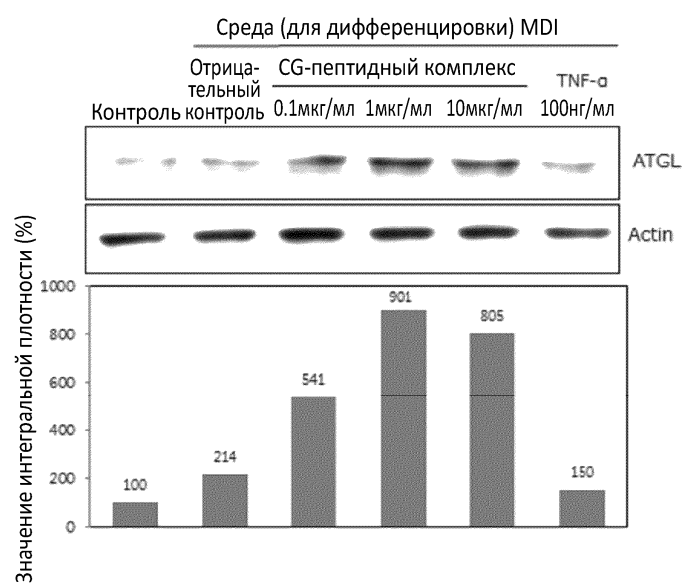
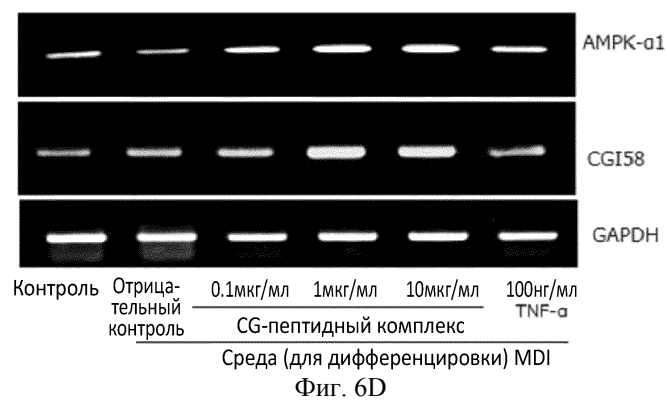
Фиг. 6А



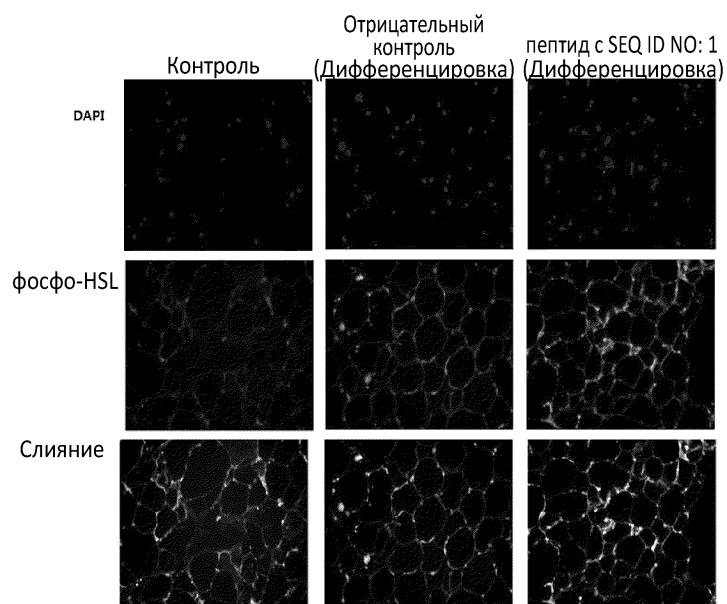
Фиг. 6В



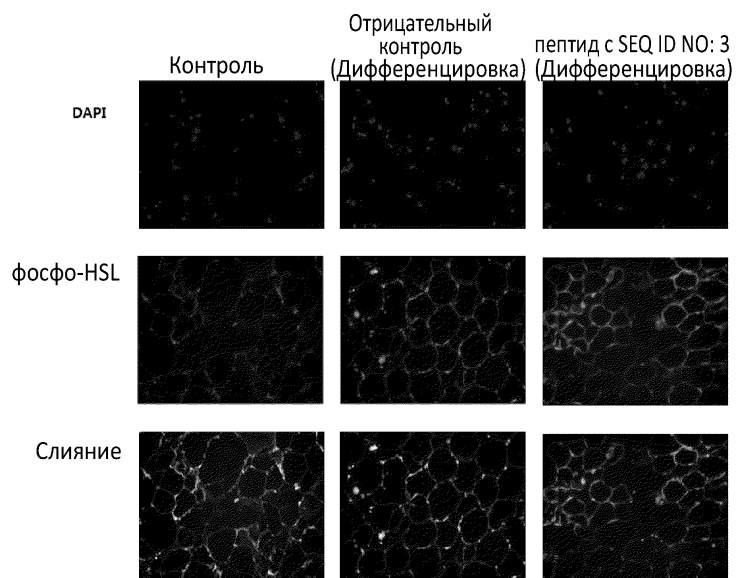
Фиг. 6С



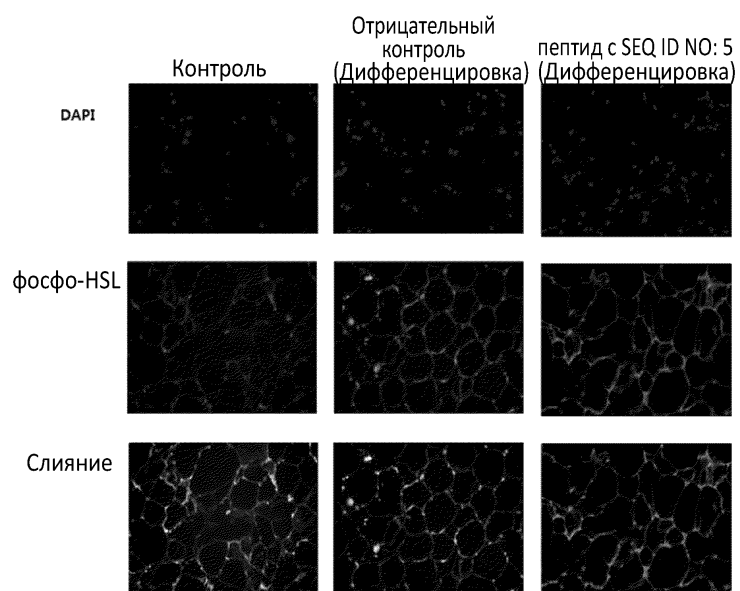
Фиг. 7



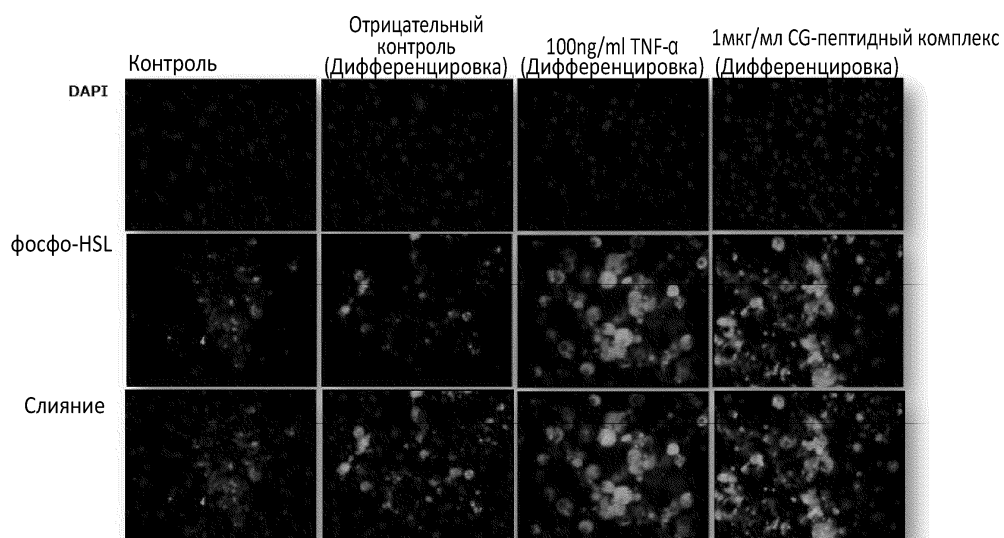
Фиг. 8А



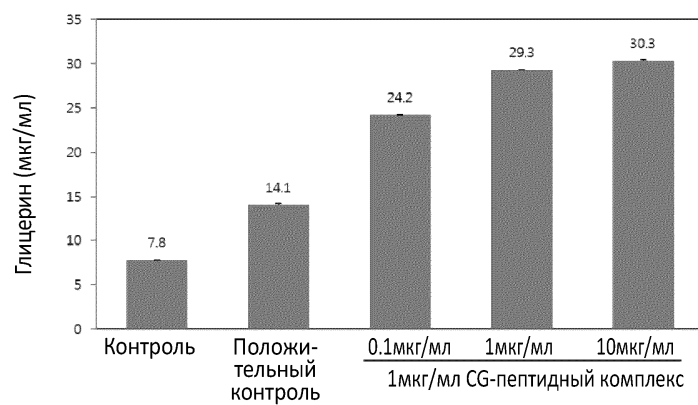
Фиг. 8B



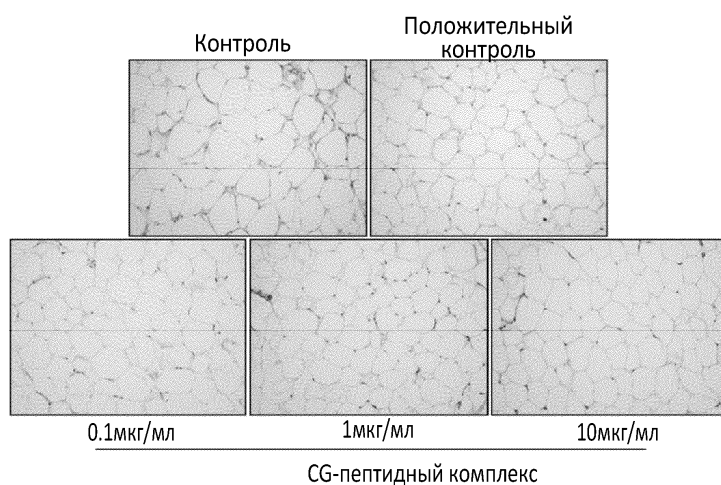
Фиг. 8C



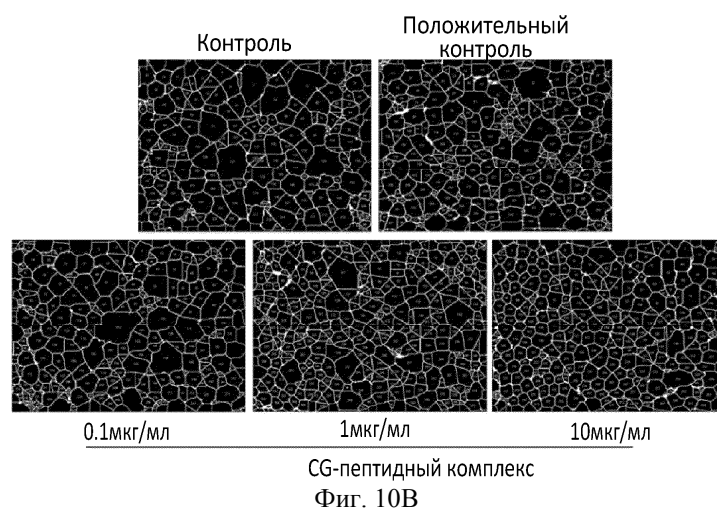
Фиг. 8D



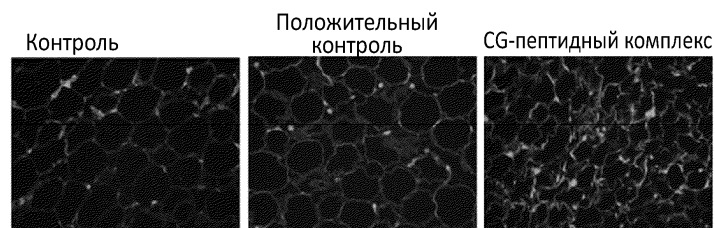
Фиг. 9



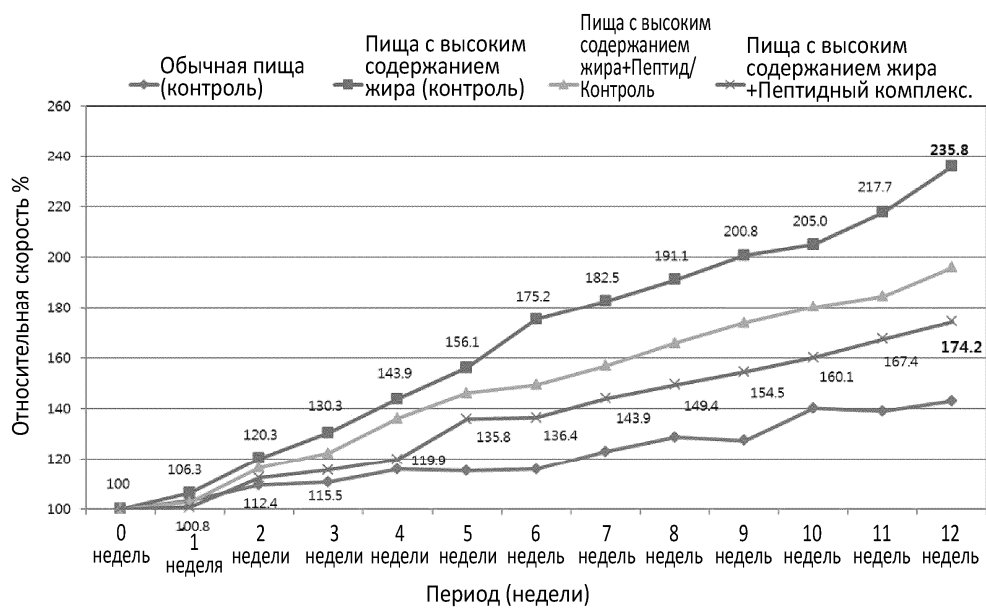
Фиг. 10А



Фиг. 10В



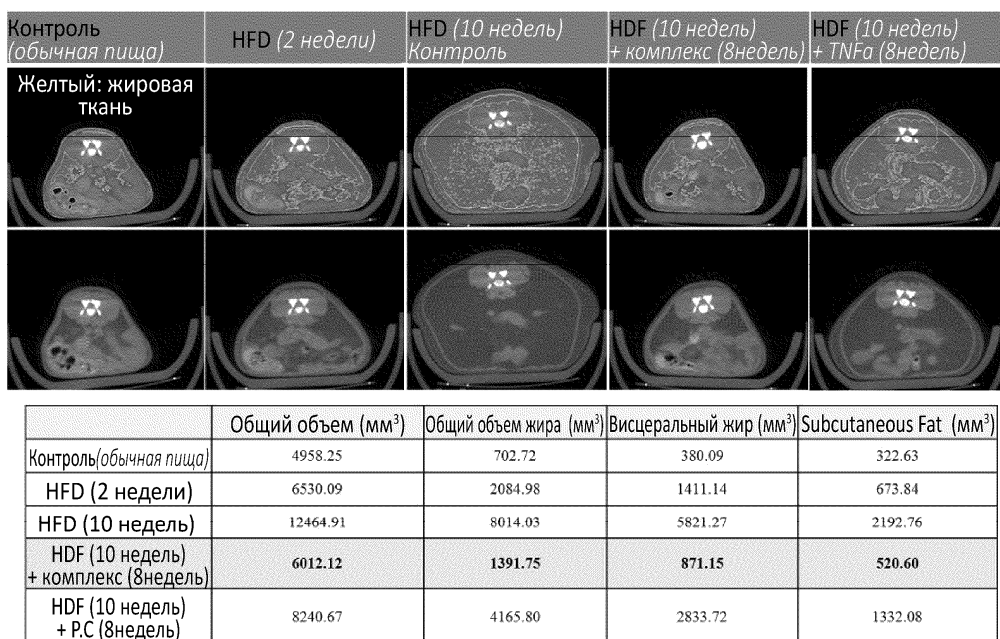
Фиг. 11



Фиг. 12



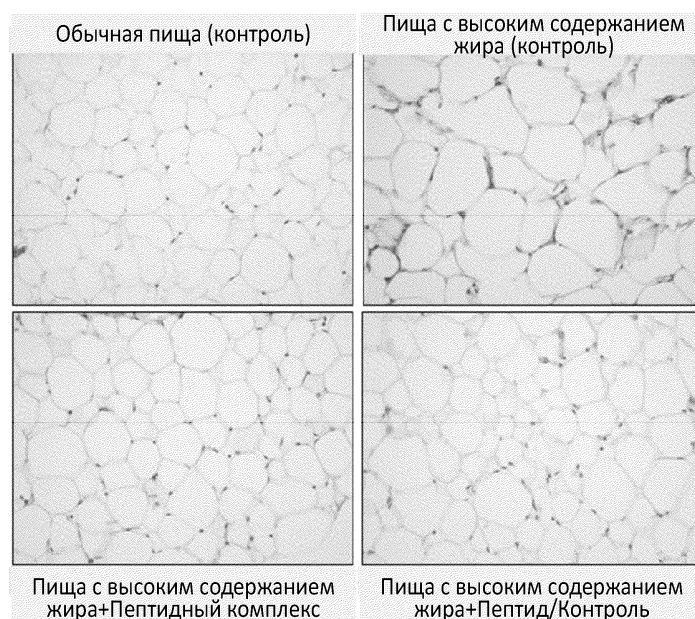
Фиг. 13



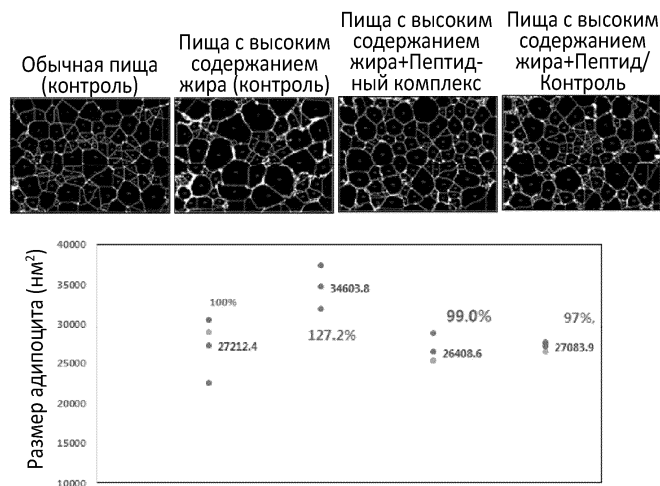
Фиг. 14



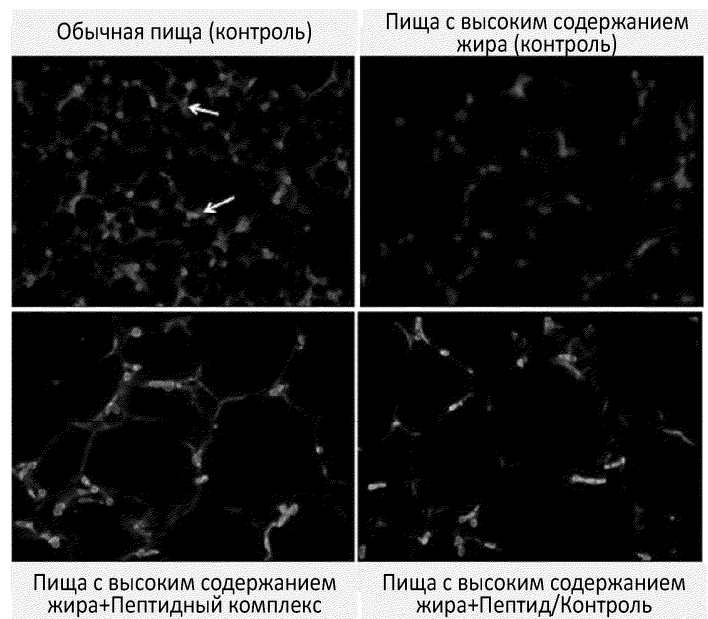
Фиг. 15



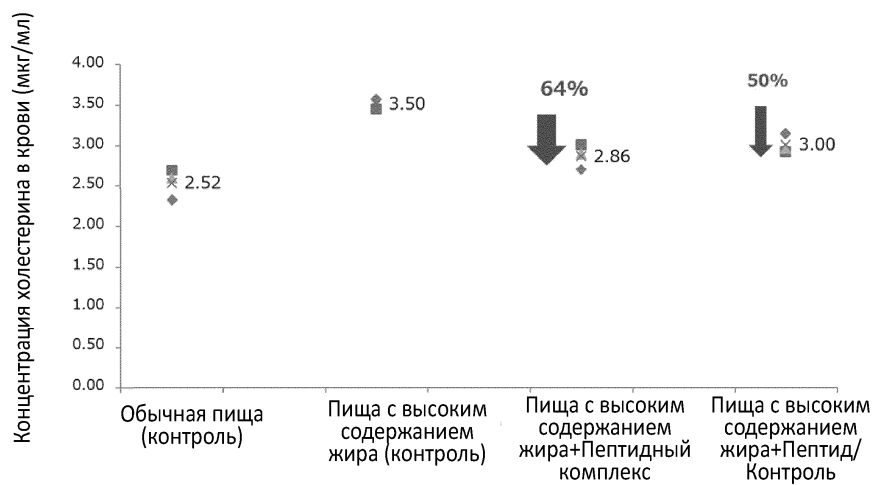
Фиг. 16А



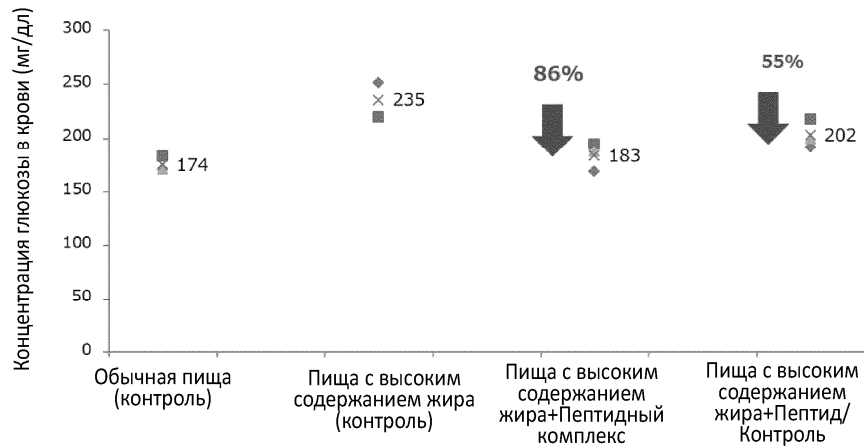
Фиг. 16В



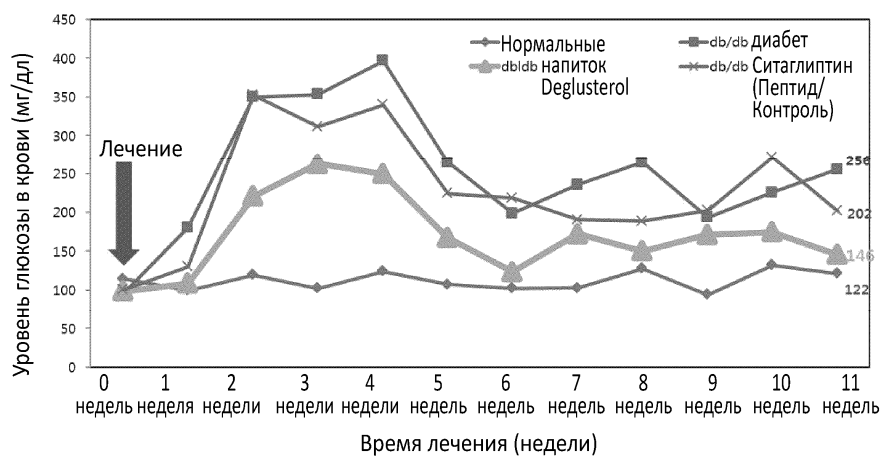
Фиг. 17



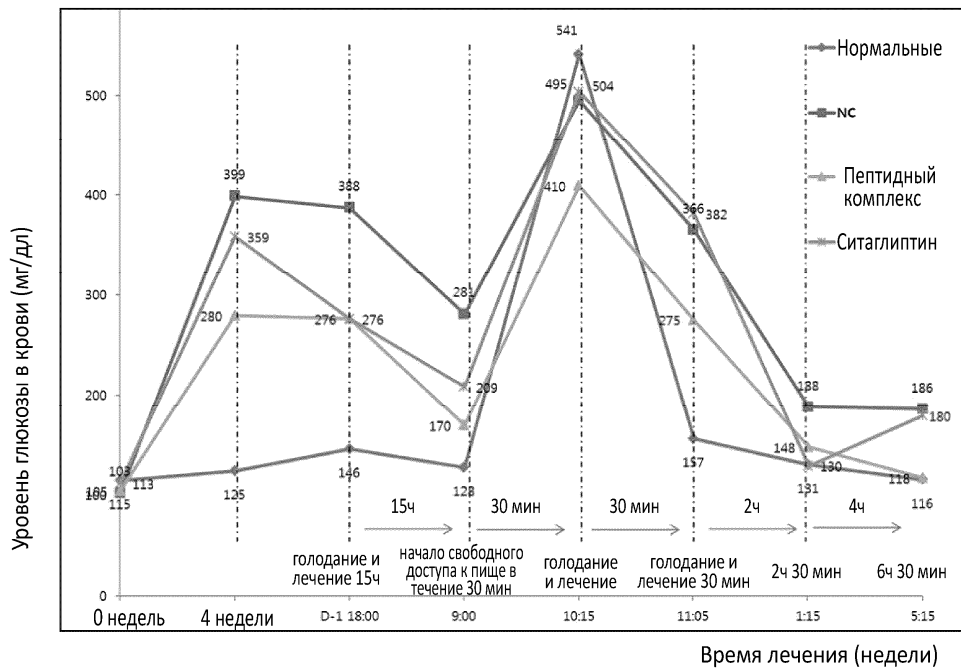
Фиг. 18



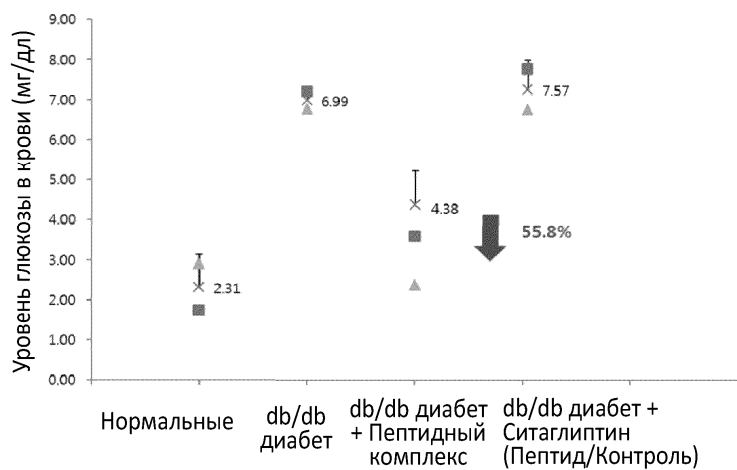
Фиг. 19



Фиг. 20А

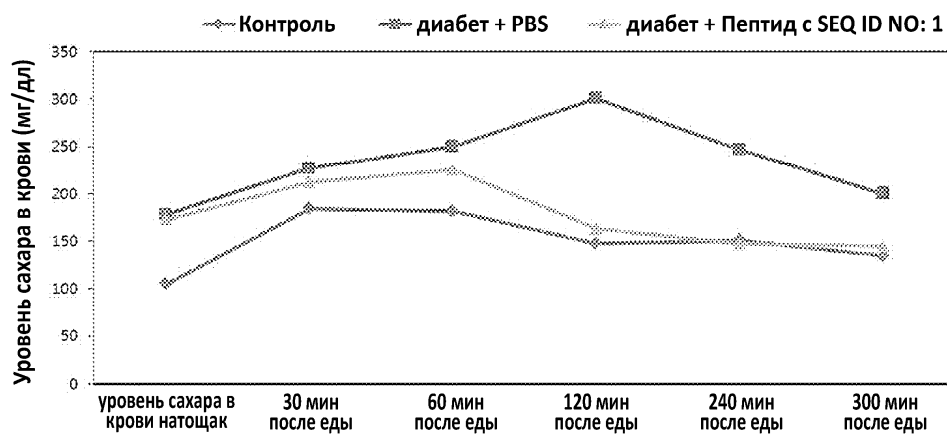


Фиг. 20В



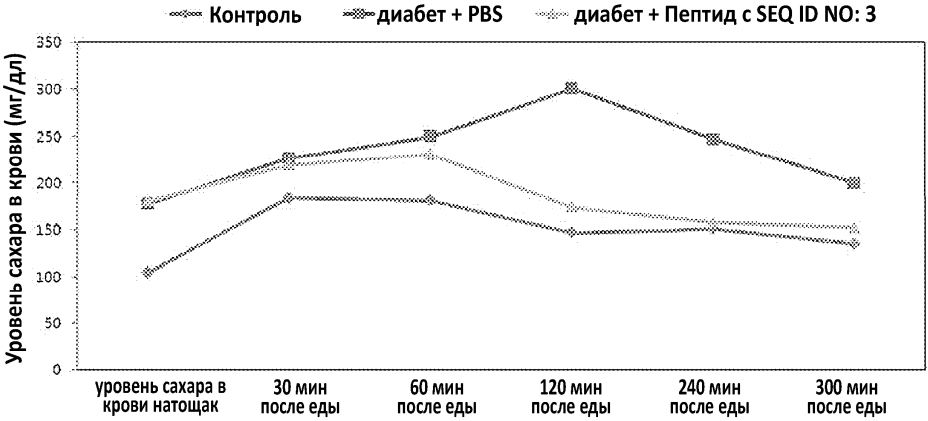
Фиг. 21

Уровень сахара в крови (мг/дл)								
		уровень сахара в крови натощак	введение пептида и прием пищи	30 мин после еды	60 мин после еды	120 мин после еды	240 мин после еды	300 мин после еды
Нормальные	Нормальные	105		184	181	147	151	135
вызванный ожирением диабет	PBS	178		227	250	301	247	200
	пептид с SEQ ID NO: 1	172		212	225	163	147	145



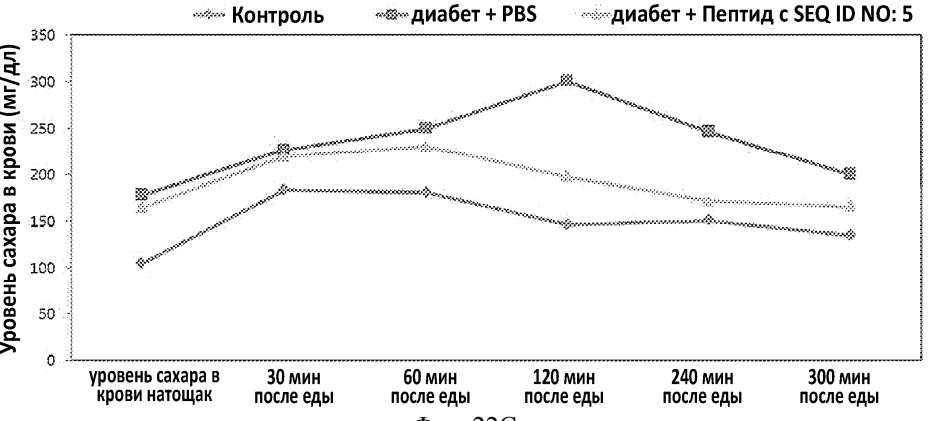
Фиг. 22А

Уровень сахара в крови (мг/дл)								
		уровень сахара в крови натощак	введение пептида и прием пищи	30 мин после еды	60 мин после еды	120 мин после еды	240 мин после еды	300 мин после еды
Нормальные	Нормальные	105		184	181	147	151	135
вызванный ожирением диабет	PBS	178		227	250	301	247	200
	пептид с SEQ ID NO: 3	181		219	231	174	158	152

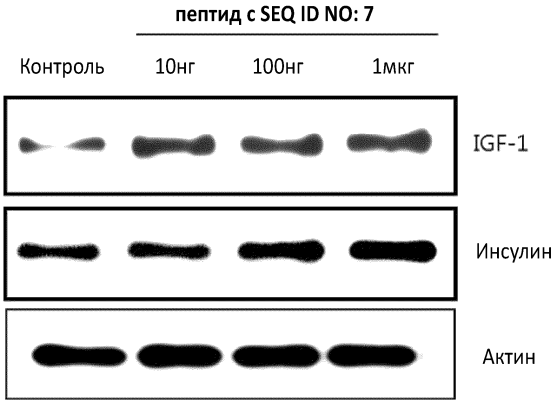


Фиг. 22В

Уровень сахара в крови (мг/дл)								
		уровень сахара в крови натощак	введение пептида и прием пищи	30 мин после еды	60 мин после еды	120 мин после еды	240 мин после еды	300 мин после еды
Нормальные	Нормальные	105		184	181	147	151	135
вызванный ожирением диабет	PBS	178		227	250	301	247	200
	пептид с SEQ ID NO: 5	165		220	231	198	172	166

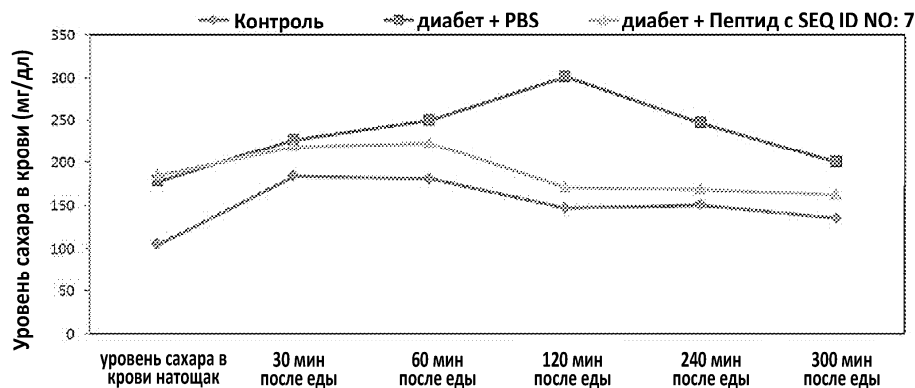


Фиг. 22С



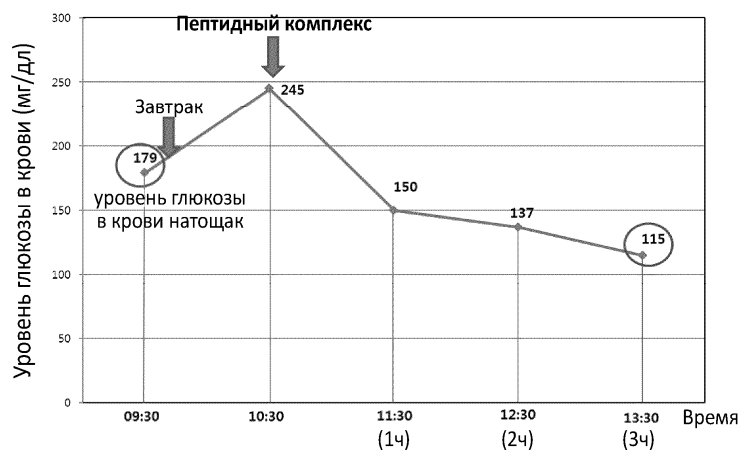
Фиг. 23

Уровень сахара в крови (мг/дл)								
		уровень сахара в крови натощак	пероральное введение пептида и прием пищи	30 мин после еды	60 мин после еды	120 мин после еды	240 мин после еды	300 мин после еды
Нормальные	Нормальные	105		184	181	147	151	135
Вызванный ожирением диабет	PBS	178		227	250	301	247	200
	пептид с SEQ ID NO: 7	185		219	223	171	169	163



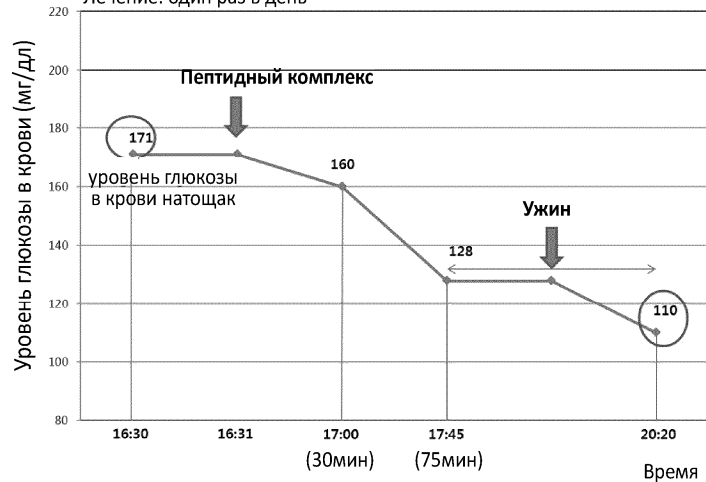
Фиг. 24

Возраст: 59
Сахарный диабет типа 2 у человека
Лечение: один раз в день



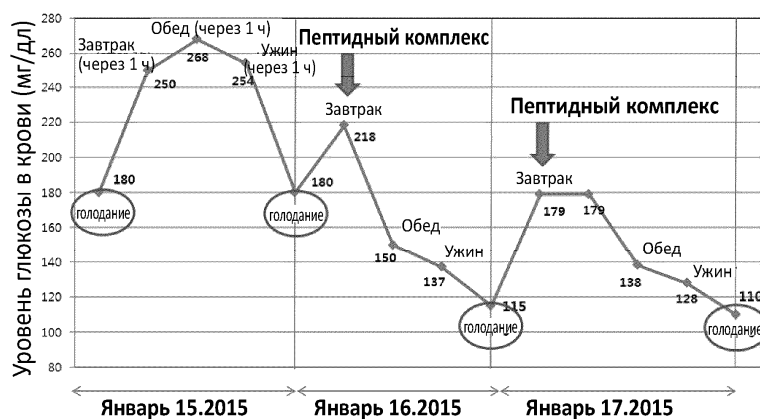
Фиг. 25А

Пол: мужчина
Возраст: 55
Сахарный диабет типа 2 у человека
Лечение: один раз в день



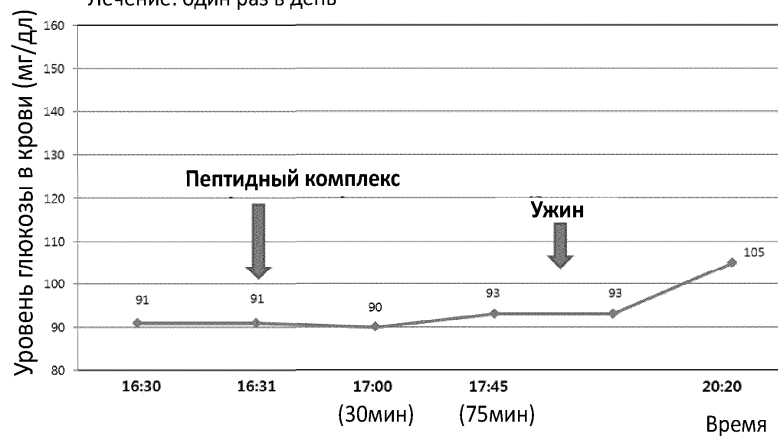
Фиг. 25В

Пол: женщина
 Возраст: 65
 Сахарный диабет типа 2 у человека
 Лечение: один раз в день



Фиг. 25С

Пол: мужчина (норма)
 Возраст: 45
 Лечение: один раз в день



Фиг. 25D

