

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191758 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.10.01

(51) Int. Cl. A61K 38/48 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.20

(54) ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ДИАБЕТА И СВЯЗАННЫХ С НИМ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 18306794.1

(32) 2018.12.21

(33) EP

(86) PCT/EP2019/086573

(87) WO 2020/127904 2020.06.25

(71) Заявитель:

ЮНИВЕРСИТЕ ДЕ СТРАСБУР;
ИНСЕРМ (ЭНСТИТУ НАСЬОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ) (FR)

(72) Изобретатель:

Марион Венсан (FR)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение касается пептидов для лечения диабета и связанных с ним заболеваний.

202191758

A1

A1

202191758

ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ДИАБЕТА И СВЯЗАННЫХ С НИМ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно оно относится к лечению диабета и связанных с ним заболеваний.

Уровень техники

Сахарный диабет или просто диабет – это группа метаболических заболеваний, при которых у человека повышается уровень сахара в крови либо потому, что поджелудочная железа не вырабатывает достаточно инсулина, либо потому, что клетки не реагируют на вырабатываемый инсулин.

Существует три основных типа диабета:

- 1-й тип возникает при неспособности организма вырабатывать инсулин и сейчас таким людям требуется вводить инсулин или носить инсулиновую помпу;
- 2-й тип возникает при инсулинорезистентности, состоянии, при котором клетки не могут правильно использовать инсулин;
- третий называется гестационным диабетом и встречается у беременных женщин.

Частота диабета 2-го типа заметно повысилась с 1960 г. параллельно с ожирением: по состоянию на 2010 год этим заболеванием страдало около 285 миллионов человек по сравнению с примерно 30 миллионами в 1985 году. Долгосрочные осложнения от высокого уровня сахара в крови могут включать сердечные заболевания, инсульты, диабетическую ретинопатию, хроническую почечную недостаточность, которая может потребовать диализа, и плохое кровообращение в конечностях, ведущее к ампутации. Может возникнуть некетозная гиперосмолярная кома.

Сообщалось, что в возникновении и прогрессировании сахарного диабета участвует гипергликемия, то есть это теория токсичности глюкозы. А именно, хроническая гипергликемия приводит к снижению секреции инсулина, а также к снижению чувствительности к инсулину, в результате чего повышается концентрация глюкозы в крови и сахарный диабет еще больше обостряется. Следовательно, при лечении гипергликемии прерывается вышеупомянутый цикл самоусиления, так что становится возможной профилактика или лечение сахарного диабета.

К сожалению, существующие методы лечения не позволяют восстановить нормогликемию в долгосрочной перспективе, так как функция β -клеток со временем снижается. Более того, сейчас не существует ни одного лекарства, способного предотвратить все аспекты этого заболевания.

Прогрессирующий характер диабета 2-го типа означает, что многим пациентам в конечном счете потребуется комбинация пероральных гипогликемических препаратов, возможно, вместе с инъекциями инсулина и/или эксенатида. Антидиабетические средства разрабатывались для противодействия основным механизмам, задействованным при диабете 2 типа: инсулинорезистентности (бигуаниды и тиазолидиндионы) и секреции инсулина (сульфонилкарбамиды, глиниды, ингибиторы дипептидилпептидазы-4, агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида 1), средства, замедляющие всасывание глюкозы в желудочно-кишечном тракте или способствующие снижению веса, а также новые средства, способствующие выведению глюкозы через почки. Однако оказалось, что большая часть этих лекарств дает вредные побочные эффекты, такие как повышение веса, периферические отеки или застойная сердечная недостаточность, а главная проблема связана с падением эффективности этих средств при длительном применении. Таким образом, несмотря на все возрастающее количество вариантов терапии для контроля гликемии, существует потребность в альтернативных и улучшенных лекарствах для лечения диабета и связанных с ним заболеваний.

Сущность изобретения

Неожиданно авторы изобретения получили пептиды из киназного домена PKC α и их производные, которые специфически улучшают переносимость глюкозы у мышей с ожирением, вызванным диетой. Пептиды способны снижать экспрессию представителя 2 семейства 27 переносчиков веществ (SLC27A2), широко известного как FATP2 (белок 2 транспорта жирных кислот) в жировой ткани. Пептиды способны снижать уровень гликированного альбумина в плазме на модели у животных, причем гликированный альбумин является хорошо известным биомаркером диабета.

Соответственно, настоящим изобретением предусмотрены пептиды для применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний, причем:

- пептиды способны специфически снижать экспрессию FATP2 в жировой ткани, в частности, у млекопитающих, особенно в жировой ткани человека;
- пептиды не содержат одновременно ни одного метионина, ни одного пролина и ни одного аргинина;
- пептиды принимают вторичную структуру, которая представляет собой спираль, предпочтительно α -спираль;
- пептиды включают, в основном состоят или состоят из последовательности от сегмента по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков киназного домена PKC (протеинкиназы C) либо сегмента от 5 до 40 последовательных остатков киназного домена PKC (протеинкиназы

С);

– пептиды имеют длину от 5 до 80 аминокислот или от 5 до 60 аминокислот или от 5 до 40 аминокислот; и

– последовательности пептидов могут содержать 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций в данной последовательности сегмента киназного домена РКС.

Предпочтительно пептиды модифицированы в процессе химического образования поперечных связей типа сшивания.

Предпочтительно пептиды имеют длину по меньшей мере в 5 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 25 аминокислот.

Предпочтительно пептиды способны ослаблять или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и α РКС.

Необязательно последовательности пептидов включают, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций,

более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52), необязательно включающей от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFQSIME (SEQ ID NO: 7), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFQSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16) необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; AFF; PDY; XDY; PEP (SEQ ID NO: 5); XEP (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

Необязательно последовательности пептидов включают, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их

комбинаций; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

Необязательно последовательности пептидов включают, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

а) VECTXVEKXVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 20), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислота, благоприятная для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранная из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

б) VECTMVEKRVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 21), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислота, благоприятная для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранная из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

с) VECTXVEKRVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 22), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислота, благоприятная для

вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранная из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

d) VECTMVEKXVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 23), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислота, благоприятная для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранная из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

и последовательностей любых сегментов из по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков любой из последовательностей от а) до d).

Необязательно последовательности пептидов включают, в основном состоят или состоят из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

VECTMXEKRVLAX (SEQ ID NO: 24)

VECTXXEKRVLAX (SEQ ID NO: 25)

VECTMXEKXVLAX (SEQ ID NO: 26)

VECTXXEKXVLAX (SEQ ID NO: 27)

VECTXXEKXVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 28)

VECTMXEKRVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 29)

VECTXXEKRVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 30)

VECTMXEKXVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 31)

VECTTXEKEVLAXLDKAAFLTQHS (SEQ ID NO: 53)

VECTTXEKEVLAXLDKAAF (SEQ ID NO: 54)

VEGTTXEKEVLAXLDKAAF (SEQ ID NO: 55)

ECTTXEKEVLAXL (SEQ ID NO 56) и

ECTMXEKKVLAXL (SEQ ID NO 57),

причем выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые остатки Xнесут сшивку и представляют собой любые производные аминокислот, подходящие для сшивания, а X – любая аминокислота, кроме M, P и R;

при этом последовательности необязательно содержат 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот, выбранные из замен, делеций, вставок и их комбинаций.

Предпочтительно указанная РКС выбрана из группы, состоящей из альфа-РКС (α -РКС), бета-РКС (β -РКС), включая β I- и β II-РКС, дельта-РКС, тета-РКС, эта-РКС и эписилон-РКС. Более предпочтительно данная РКС представляет собой α -РКС по SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном воплощении последовательности пептидов включают, в основном состоят или состоят из VECTTREKEVLASLDKAAFLTQLHS (SEQ ID NO: 32), где R и S несут сшивку и предпочтительно представляют собой 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин, соответственно;

причем последовательности необязательно содержат 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот, выбранные из замен, делеций, вставок и их комбинаций.

Настоящим изобретением также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие пептиды по настоящему изобретению для применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний. Также предусмотрено применение пептидов по настоящему изобретению для изготовления лекарственных средств для лечения диабета и связанных с ним заболеваний.

Необязательно диабет и связанные с ним заболевания выбирают из группы, состоящей из диабета I типа, диабета II типа, инсулинорезистентности, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, гипергликемии, ожирения, гиперинсулинемии и синдрома Барде-Бидла. Необязательно пептиды применяются в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из антидиабетических средств, гиполипидемических средств, средств против ожирения, антигипертензивных средств, антистеатотических средств, противовоспалительных средств и агонистов рецепторов активаторов-пролифераторов пероксисом.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Активность киназы РКС в адипоцитах человека, индуцированная пептидами из альфа-РКС. Первичные адипоциты человека культивировали в течение ночи без инсулина, а на следующий день использовали различные условия для каждого пептида. В каждую лунку вносили 25 мкг пептида ECTMVEKKVLALL или 25 мкг

пептида SVEWWAYGLLYEMLA и инкубировали в течение 30 мин, а затем измеряли активность РКС. Отрицательным контролем служил носитель – физраствор, а положительным контролем служил инсулин в концентрации 10 мМ.

Фиг. 2. Уровень экспрессии изоформ FATP в адипоцитах человека при обработке пептидами, полученными из альфа-РКС человека. После 48 часов инкубации с различными пептидами, полученными из альфа-РКС (а именно ECTMVEKKVLALL и SVEWWAYGLLYEMLA), измеряли уровни экспрессии шести изоформ FATP методом ПЦР в реальном времени. Нормализованные уровни экспрессии шести изоформ FATP (Fatp1-6) в адипоцитах человека. В качестве контрольного гена использовали GAPDH.

Фиг. 3. Кривая доза-эффект для PATAS *in vitro* по запуску активности РКС в адипоцитах человека. Кривая доза-эффект для PATAS *in vitro* по запуску активности РКС в адипоцитах человека после 30-минутной инкубации первичных адипоцитов человека с PATAS, добавленным в культуральную среду. N = 5 на группу, а количества PATAS выражали в мкг на лунку.

Фиг. 4. Поглощение глюкозы в первичных зрелых адипоцитах человека. N = 8 на группу. Пептид ADPIF столь же эффективно, как и инсулин, запускает всасывание глюкозы в первичных зрелых адипоцитах человека.

Фиг. 5. Пептид ADPIF более активно, чем пептид PATAD, улучшает непереносимость глюкозы у мышей.

(А) Переносимость глюкозы. Мышам в день 0 вводили либо носитель (физраствор), либо носитель + PATAD 417 или носитель + ADPIF (CPC-пептид A-MRO). Через 6 дней (D6) мышей не кормили в течение 4 часов, а в 0 мин делали подкожную инъекцию глюкозы для проведения ipGTT. Измеряли уровни глюкозы в крови из хвостовой вены каждые 30 минут. Помимо контрольных мышей, получавших обычный корм (CTL Chow), все другие мыши получали корм с высоким содержанием жира и глюкозы.

(В) Соответствующие площади под кривой (AUC) при тестировании на переносимость глюкозы, представленном в (А), проявляющие падение AUC в ответ на инъекцию PATAD (PATAD417) или ADPIF (PATAD417-MRP), свидетельствующее о том, что ADPIF снижает AUC более эффективно, чем PATAD. Это значит, что ADPIF более эффективно улучшает непереносимость глюкозы, чем PATAD.

Фиг. 6. PATAS оказывает антидиабетический эффект на общепринятой модели заболевания у мышей (db/db; BKS от Jax Labs), связанное со снижением уровня экспрессии FATP2 в жировой ткани.

(А) Кривая изменения уровня глюкозы в крови во время ipGTT на 4-й день после подкожной инъекции PATAS (дозировка PATAS: 2 мг/кг массы тела) у 6-недельных

самцов мышей db/db на обычном корме после 8 часов голодания. В $t = 0$ мин подкожно вводили глюкозу болюсом (2 г/кг массы тела) и получали при этом гистограмму AUC ($n = 10$ мышей на группу; значимость устанавливали при значениях * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

(В) После 4 еженедельных инъекций PATAS и еще 4 недель без обработки, sWAT у мышей db/db. Определяли нормализованные уровни экспрессии шести изоформ FATP (FATP 1-6) в подкожной белой жировой ткани (sWAT). $N = 6$ на группу, GAPDH в качестве контрольного гена.

Фиг. 7. PATAS эффективно улучшает непереносимость глюкозы на генетической модели у мышей при редком заболевании, связанном с ожирением и диабетом 2-го типа, синдроме Барде-Бидла (BBS). Мышам BBS давали обычный корм *ad libitum*. $N = 4$ мыши с перекрестной постановкой экспериментов с проведением ipGTT перед инъекцией и через 3 дня после инъекции. На модели с нокаутом гена BBS10 ($Bbs10^{-/-}$) получали мышей, которые спонтанно становились тучными, как описано в литературе. В 4-месячном возрасте у $Bbs10^{-/-}$ проводили тест на переносимость глюкозы внутрибрюшинно (ipGTT) перед введением PATAS и обнаружили, что мыши $Bbs10^{-/-}$ не переносят глюкозу (фиг. 7А) при соответствующей площади под кривой (AUC) ~ 30000 мг/дл·мин (фиг. 7В). Тем же мышам вводили PATAS по 2 мг/кг массы тела в подкожную жировую ткань, а через 3 дня проводили ipGTT и обнаружили, что у мышей $Bbs10^{-/-}$ проявляется улучшение переносимости глюкозы (фиг. 7А), соответствующее падению AUC до ~ 16000 мг/дл·мин (фиг. 7В).

Фиг. 8. Влияние ADPIF на гликированный альбумин в плазме мышей на модели STAM. Измеряли уровни циркулирующего гликированного альбумина в плазме обработанных мышей из японской модели STAMT с помощью коммерческого набора. На этом рисунке представлены результаты в виде средних значений от 6 мышей на группу со стандартной ошибкой среднего для планок погрешностей. После 5 еженедельных инъекций ADPIF у соответствующих мышей отмечалось значительное падение уровня гликированного альбумина по сравнению с группой мышей, получавших носитель.

Раскрытие сущности изобретения

Вне ожидания, авторы изобретения получили пептиды из киназного домена PKC α и их производные, которые специфически снижают экспрессию FATP2 (белка 2 транспорта жирных кислот) в жировой ткани. Наконец, пептиды способны снижать уровень гликированного альбумина в плазме, который является биомаркером диабета.

Следовательно, описанные здесь пептиды применимы для лечения диабета и связанных с ним заболеваний.

Сахарный диабет характеризуется гипергликемией. В частности, диабет 2-го типа

характеризуется гипергликемией и инсулинорезистентностью. Основной причиной диабета 2 типа у людей, генетически предрасположенных к этому заболеванию, считается ожирение. Диабетическая ретинопатия, диабетическая невропатия, диабетическая нефропатия – хорошо известные заболевания, связанные с диабетом и инсулинорезистентностью. Поэтому снижение гликемии за счет увеличения поглощения глюкозы может лечить или замедлять течение или возникновение этих заболеваний.

Соответственно, изобретением предусмотрены:

- пептиды, как определено здесь, для применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний;
- фармацевтические композиции, содержащие пептиды, как определено здесь, для применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний;
- применение пептидов или фармацевтических композиций, как определено здесь, для изготовления лекарственных средств для лечения диабета и связанных с ним заболеваний;
- способ лечения диабета и связанных с ним заболеваний у субъектов, включающий введение терапевтически эффективного количества пептида, как определено здесь.

Определения

ALMS1, то есть белок 1 синдрома Альстрёма, кодируется геном ALMS1. Мутации в гене ALMS1 оказались причиной синдрома Альстрёма. Он описан в нескольких базах данных, а именно в UniProt ID No. Q8TCU4; Gene ID No. 7840, HGNG ID No. 428. Контрольные последовательности приведены в Genbank под номером NM_015120.4 для мРНК и NP_055935.4 для белка.

Термины “протеинкиназа C” и “PKC” (EC 2.7.11.13) эквивалентны и относятся к семейству ферментов протеинкиназ, задействованных в контроле функции других белков посредством фосфорилирования гидроксильных групп аминокислотных остатков серина и треонина на этих белках. Обычно PKC активируются такими сигналами, как повышение концентрации диацилглицерина (DAG) или ионов кальция (Ca^{2+}). PKC играют важную роль в нескольких каскадах передачи сигналов.

Семейство PKC включает как минимум 15 изоферментов у человека, разделенных на три основных подсемейства: обычные (или классические) PKC, новые PKC и атипичные PKC.

Обычные (с) PKC включают изоформы α , βI , βII и γ . Этим PKC для активации требуется Ca^{2+} , DAG и фосфолипиды типа фосфатидилсерина.

Новые (n) PKC включают изоформы δ , ϵ , η и θ . Этим PKC для активации требуется

DAG, но не требуется Ca^{2+} .

Атипичные (а) PKC включают изоформы ζ , ι и λ . Этим PKC для активации не требуется ни Ca^{2+} , ни диацилглицерин.

Протеинкиназы С типа альфа, также называемые α PKC, PKC-A или PKC-alpha, принадлежит к семейству специфичных для серина и треонина протеинкиназ, которые могут активироваться кальцием и вторым посредником – диацилглицерином. Они описаны в нескольких базах данных, а именно в UniProt ID No. P17252, Gene ID No. 9393, HGNG ID No. 5578. Контрольные последовательности приведены в Genbank под номером NM_02737.2 для мРНК и NP_002728.1 для белка. Последовательность белка α PKC человека приведена в SEQ ID NO: 1.

Киназный домен α PKC находится от положения 339 до положения 595, как изложено в SEQ ID NO: 1 и представлено в SEQ ID NO: 2.

“Состоит из”, “в основном состоит из” или “в основном включает”: описание здесь любого аспекта или воплощения изобретения с помощью таких терминов, как ссылка на элемент или элементы, должно обеспечивать поддержку аналогичного аспекта или воплощения изобретения, “состоящего из”, “в основном состоящего из” или “в основном включающего” этот конкретный элемент или элементы, если не указано иначе или явно противоречит контексту. Например, пептид или белок, описанный здесь как включающий конкретную последовательность, следует понимать как описывающий также пептид или белок, состоящий из этой последовательности, если не указано иначе или явно противоречит контексту. “В основном состоит из” означает то, что пептид или белок состоит из этой последовательности, но он также может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, вставок, делеций либо их комбинаций, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок, делеций либо их комбинаций. В частности, “в основном состоит из” может означать то, что пептид включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных аминокислот на N- и/или C-конце, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 дополнительных аминокислот, и/или 1, 2 или 3 замены, делеции, вставки либо их комбинации. Предпочтительно количество замен, вставок, делеций либо их комбинаций зависит от длины последовательности. Например, содержание замен, делеций, вставок либо их комбинаций может составлять не более 30%, предпочтительно не более 25%.

В настоящем изобретении термин “замена” означает замену одной аминокислоты на другую в последовательности пептида.

В настоящем изобретении термин “делеция” означает удаление одной аминокислоты в последовательности пептида.

В настоящем изобретении термины “вставка” или “добавление” эквивалентны и

означают добавление одной аминокислоты в последовательности пептида.

Под “заменами, вставками, делециями” подразумеваются замены, вставки, делеции одной аминокислоты. Поэтому, когда речь идет об “1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 заменах, вставках, делециях либо их комбинациях”, “1, 2, 3, 4 или 5 заменах, вставках, делециях либо их комбинациях” или “1, 2 или 3 заменах, вставках, делециях либо их комбинациях”, то это означает, соответственно, “1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот, выбранных из замен, вставок, делеций либо их комбинаций”, “1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, вставок, делеций либо их комбинаций” или же “1, 2 или 3 модификации аминокислот, выбранные из замен, вставок, делеций либо их комбинаций”. “1, 2, 3, 4 или 5 замен, вставок, делеций либо их комбинаций” также означает “от 1 до 5 замен, вставок, делеций либо их комбинаций”. А “1, 2 или 3 замены, вставки, делеции либо их комбинации” также означает “от 1 до 3 замен, вставок, делеций либо их комбинаций”.

В последовательностях приведенных здесь пептидов аминокислоты представлены в однобуквенной кодировке по следующей номенклатуре: А: аланин; С: цистеин; D: аспарагиновая кислота; Е: глутаминовая кислота; F: фенилаланин; G: глицин; H: гистидин; I: изолейцин; K: лизин; L: лейцин; M: метионин; N: аспарагин; P: пролин; Q: глутамин; R: аргинин; S: серин; T: треонин; V: валин; W: триптофан и Y: тирозин.

В настоящем изобретении термины “идентичность последовательностей” либо “идентичность” означают точное соответствие двух пептидов по каждой аминокислоте. Степень идентичности можно определить путем прямого сравнения информации о последовательностях между двумя молекулами путем выравнивания последовательностей, подсчета точного количества совпадений между выровненными последовательностями, деления на длину более короткой последовательности и умножения результата на 100.

Идентичность последовательностей можно определить путем выравнивания последовательностей двух пептидов с помощью алгоритмов глобального или локального выравнивания, в зависимости от длины двух последовательностей. Последовательности близкой длины предпочтительно выравнивают с помощью алгоритмов глобального выравнивания (напр., Needleman-Wunsch), которые выравнивают последовательности оптимально по всей длине, тогда как последовательности существенно различной длины предпочтительно выравнивают с помощью алгоритма локального выравнивания (напр., Smith-Waterman). Затем последовательности можно называть “практически идентичными” или “существенно подобными”, если они (при оптимальном выравнивании, к примеру, по программе GAP или BESTFIT с параметрами по умолчанию) имеют хотя бы некий

минимальный процент идентичности последовательностей. В программе GAP применяется алгоритм глобального выравнивания Needleman-Wunsch для выравнивания двух последовательностей по всей их длине (полной длине), максимизируя количество совпадений и минимизируя количество пробелов. Глобальное выравнивание обычно применяется для определения идентичности последовательностей, когда две последовательности имеют близкую длину.

“Повышается”, “повышение” или “усиление” означает то, что измерение повышается как минимум на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с измерением, проведенным в отсутствие исследуемой молекулы в тех же условиях. “Снижается” или “снижение” означает то, что измерение снижается как минимум на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с измерением, проведенным в отсутствие исследуемой молекулы в тех же условиях.

В настоящем изобретении термин “лечение”, “лечить” или “лечиться” означает любое действие, направленное на улучшение состояния здоровья пациентов, как-то излечение, облегчение или замедление заболевания. Он включает как профилактическое, так и терапевтическое лечение.

Термин “лечение”, в частности, означает коррекцию, замедление или уменьшение нарушения гомеостаза глюкозы. Термин “лечение” также означает улучшение захвата глюкозы (напр., захвата глюкозы адипоцитами). В контексте изобретения термины “контролирование уровня глюкозы в крови” или “контроль уровня глюкозы в крови” означают нормализацию или регулирование уровня глюкозы в крови или плазме у субъектов-млекопитающих с аномальным уровнем (т.е. уровнем ниже или выше известного эталонного, медианного или среднего значения у соответствующих субъектов-млекопитающих с нормальным гомеостазом глюкозы).

В настоящем изобретении термин “эффективное количество” означает такое количество пептида по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, которое лечит или замедляет течение или возникновение диабета или связанного с ним заболевания. Он также может означать такое количество пептида по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, которое лечит или задерживает диабет или связанное с ним заболевание.

В настоящем изобретении термины “действующее начало”, “активный ингредиент” и “активный фармацевтический ингредиент” эквивалентны и относятся к компоненту фармацевтической композиции, дающему терапевтический эффект.

В настоящем изобретении термин “терапевтический эффект” означает эффект, индуцируемый активным ингредиентом типа пептида по настоящему изобретению или

фармацевтической композицией по настоящему изобретению, способный лечить или замедлять течение или возникновение диабета или связанного с ним заболевания.

В настоящем изобретении термин “эксципиент или фармацевтически приемлемый носитель” означает любой ингредиент, за исключением активных ингредиентов, который присутствует в фармацевтической композиции. Его добавление может быть направлено на придание конечному продукту определенной консистенции или других физических или вкусовых свойств. Наполнитель или фармацевтически приемлемый носитель должен быть лишен каких-либо взаимодействий, в частности химических, с активными ингредиентами.

В настоящем изобретении термины “субъект”, “индивид” или “пациент” являются взаимозаменяемыми и относятся к животным, предпочтительно к млекопитающим, еще более предпочтительно к людям, включая взрослых, детей, новорожденных и людей на пренатальной стадии.

В настоящем изобретении термин “примерно” означает диапазон значений $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, “около 50” включает значения $\pm 10\%$ от 50, то есть значения в пределах от 45 до 55. Предпочтительно термин “примерно” означает диапазон значений $\pm 5\%$ от указанного значения.

Пептиды

Пептиды по настоящему изобретению имеют следующие характеристики:

- они не содержат одновременно ни одного метионина, ни одного пролина и ни одного аргинина;
- они предпочтительно принимают вторичную структуру, которая представляет собой спираль, предпочтительно α -спираль;
- они включают, в основном состоят или состоят из последовательности одного сегмента киназного домена РКС (протеинкиназы C), предпочтительно сегмента по меньшей мере из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков киназного домена РКС (протеинкиназы C) либо сегмента от 5 до 40 последовательных остатков киназного домена РКС (протеинкиназы C);
- последовательности пептидов могут содержать 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций в данной последовательности сегмента киназного домена РКС.

Пептиды также могут иметь одну или несколько из следующих характеристик:

- они имеют длину менее 80 аминокислот, более предпочтительно менее 60 аминокислот, еще более предпочтительно менее 40 аминокислот и даже еще более предпочтительно менее 30 аминокислот;
- они имеют длину по меньшей мере в 5 аминокислот и менее 40 аминокислот,

предпочтительно по меньшей мере 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот и менее 25 аминокислот;

- они модифицированы посредством сшивки;
- они способны нарушать взаимодействие ALMS1-РКС, в частности, ослаблять или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и α РКС; или же они не способны нарушать взаимодействие ALMS1-РКС, в частности, ослаблять или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и α РКС;
- они модифицируют уровни экспрессии FATP в жировой ткани, предпочтительно снижают экспрессию FATP2 в жировой ткани.

Пептиды также могут иметь одну или несколько из следующих характеристик:

- они имеют длину менее 80 аминокислот, более предпочтительно менее 60 аминокислот, еще более предпочтительно менее 40 аминокислот и даже еще более предпочтительно менее 30 аминокислот;
- они имеют длину по меньшей мере в 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот и менее 25 аминокислот;
- они модифицированы посредством сшивки;
- они не способны нарушать взаимодействие ALMS1-РКС, в частности, ослаблять или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и α РКС.

В одном аспекте пептиды по настоящему изобретению включают, в основном состоят или состоят из последовательности одного сегмента киназного домена РКС (протеинкиназы С). РКС может быть выбрана из обычных РКС, новых РКС и атипичных РКС. В частности, РКС может быть выбрана из обычных РКС. Предпочтительно РКС может быть выбрана из группы, состоящей из РКС α , β I, β II и γ . Более предпочтительно РКС может быть выбрана из группы, состоящей из РКС α , β I и β II. Еще более предпочтительно РКС представляет собой α РКС, предпочтительно α РКС человека, более предпочтительно α РКС человека по SEQ ID NO: 1. Киназный домен α РКС человека приведен в SEQ ID NO: 2.

Сегмент киназного домена РКС содержит по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков киназного домена РКС. В одном аспекте сегмент киназного домена РКС содержит от 5 до 40 последовательных остатков киназного домена РКС (необязательно от 5 до 30 или от 5 до 25 или от 7 до 25 или от 8 до 25 или от 9 до 25 или от 10 до 25 или от 11 до 25 или от 12 до

25).

Киназный домен РКС, из которого выбирают этот сегмент, предпочтительно по меньшей мере на 40% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2, более предпочтительно по меньшей мере на 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно последовательность данного сегмента киназного домена РКС по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% соответствует последовательности пептида. В одном конкретном воплощении последовательность пептида по настоящему изобретению состоит из последовательности сегмента по SEQ ID NO: 1.

Если сегмент киназного домена РКС содержит один метионин и/или один пролин и/или один аргинин, то последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина и/или все остатки метионина и/или все остатки аргинина. Например, последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина. Или же последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки метионина. Или же последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки аргинина. В одном аспекте последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина и метионина. В другом аспекте последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина и аргинина. Еще в другом аспекте последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки метионина и аргинина. Более предпочтительно последовательность может быть модифицирована (т.е. путем введения замен) так, чтобы удалить все остатки пролина, все остатки метионина и все остатки аргинина.

Предпочтительно пептиды содержат не более 20, предпочтительно не более 15, более предпочтительно не более 10 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций. В особенно предпочтительном воплощении пептиды могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5, более предпочтительно 1, 2 или 3.

Например, пептиды по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% идентичны последовательности сегмента киназного домена РКС, предпочтительно по SEQ ID No 2. В одном воплощении часть последовательности пептида, соответствующая

SEQ ID No 2, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% идентична последовательности сегмента по SEQ ID No 2.

В одном конкретном аспекте пептиды содержат по меньшей мере одну замену, делецию или вставку аминокислоты по сравнению с последовательностью сегмента киназного домена РКС, предпочтительно по SEQ ID No 2.

Например, последовательность сегмента киназного домена РКС может принадлежать последовательностям между положениями 339 и 432 по SEQ ID NO: 1, между положениями 434 и 544 по SEQ ID NO: 1, между положениями 546 и 561 по SEQ ID NO: 1, между положениями 563 и 565 по SEQ ID NO: 1 или между положениями 568 и 595 по SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении последовательность сегмента киназного домена РКС может не включать следующие остатки: G433, E545, S562, S566 по SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте пептиды по настоящему изобретению имеют структуру альфа-спирали. В настоящем изобретении термины “альфа-спираль”, “ α -спираль”, “классическая α -спираль Полинга-Кори-Брэнсона” и “спираль 3,613” эквивалентны и заменяют друг друга. Термин “альфа-спираль” относится к общему мотиву во вторичной структуре белков, который представляет собой свернутую вправо или спиральную конформацию (спираль), в которой каждая группа N–H основной цепи образует водородную связь с группой C=O аминокислоты, расположенной на три или четыре остатка раньше в последовательности белка. Альфа-спираль содержит в среднем около 3,6 остатков на 1 виток спирали, а в кольцо, образованное водородной связью, входит 13 атомов.

В одном конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют структуру альфа-спирали и/или имеют последовательность, которая предполагает структуру альфа-спирали. Методы определения структуры пептидов типа кругового дихроизма или ЯМР хорошо известны специалистам в данной области. Точно так же специалистам в данной области хорошо известны методы прогнозирования структуры альфа-спирали у пептидов типа STRIDE (Frishman D., Argos P., *Proteins*, vol. 23, no 4, 1995, p. 566-579); DEFINE (Richards F. M., Kundrot C. E., *Proteins*, vol. 3, no 2, 1988, p. 71-84); DSSP (Touw et al., *Nucleic Acids Research* 2015, 43: D364-D368; Kabsch & Sander, *Biopolymers*, 1983, 22, 2577-2637).

Альфа-спирали располагаются в киназном домене в следующих положениях: 372-377; 381-392; 425-432; 437-456; 466-468; 502-504; 507-510; 518-533; 543-552; 563-572; 577-579; 587-593 и 595-597 по SEQ ID NO: 1.

Соответственно, пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

- VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3);
- LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4);
- LDN;
- PDY;
- PEII (SEQ ID NO: 5);
- SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6);
- EDEDELFQSIME (SEQ ID NO: 7);
- PAK;
- GERDVRE (SEQ ID NO: 8);
- AFF.

В одном конкретном воплощении пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

- VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); и
- GERDVRE (SEQ ID NO: 8).

Необязательно пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); LDN; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52); EDEDELFQSIME (SEQ ID NO: 7); EDEDELFQSIKE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); LDN; AFF; PDY; XDY; PEII (SEQ ID NO: 5); XEII (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R. Предпочтительно аминокислота X благоприятна для вторичной структуры α -спирали. Например, X может быть выбрана из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

В одном аспекте пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52); EDEDELFQSIME (SEQ ID NO: 7); EDEDELFQSIKE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); где X – любая

аминокислота, кроме М, Р и R. В одном конкретном аспекте пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), где X означает К. В другом конкретном аспекте пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52), где X означает Е.

В частности, пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); где X – любая аминокислота, кроме М, Р и R. Например, пептиды могут включать по меньшей мере одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA или VECTTVEKEVLA (SEQ ID NO: 19).

Необязательно пептиды содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, делеций, вставок либо их комбинаций, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5 замен, делеций, вставок либо их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 замены.

Необязательно пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно

с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSQIME (SEQ ID NO: 7), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; AFF; PDY; XDY; PEI (SEQ ID NO: 5); XEI (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R. Предпочтительно аминокислота X благоприятна для вторичной структуры α -спирали. Например, X может быть выбрана из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

В одном аспекте пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями

аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSQIME (SEQ ID NO: 7), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R. Предпочтительно аминокислота X благоприятна для вторичной структуры α -спирали. Например, X может быть выбрана из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

В частности, пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно с 1, 2 или

3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R. Предпочтительно аминокислота X благоприятна для вторичной структуры α -спирали. Например, X может быть выбрана из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

Например, пептиды могут включать по меньшей мере одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA или VECTTVEKEVLA (SEQ ID NO: 19).

В одном аспекте пептиды могут включать, в основном состоять или состоять из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

a) VECTXVEKXVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 20), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятную для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

b) VECTMVEKRVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 21), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятную для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

c) VECTXVEKRVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 22), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятную для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

комбинаций;

d) VECTMVEKXVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 23), где X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятную для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, необязательно с 1, 2, 3, 4 или 5 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно с 1, 2 или 3 модификациями аминокислот, выбранными из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

и последовательностей любых сегментов из по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 25 последовательных остатков любой из последовательностей от a) до d).

В другом конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению составляют или модифицируют с тем, чтобы они сохраняли конформацию альфа-спирали. Как известно в данной области, это достигается различными методами, включая модификацию аминокислотной последовательности с заменой аминокислот, не имеющих критического значения для биологических эффектов, использование неприродных аминокислот, циклизацию пептидов и модификацию каркаса пептидов или добавление химических связей между аминокислотами в пептидной цепи. Такие модификации пептидов могут проводиться, к примеру, для повышения их термической стабильности и устойчивости к протеазам.

В частности, пептиды по настоящему изобретению модифицируют посредством химической поперечной сшивки. Например, пептид может быть сшитым. В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению являются сшитыми. Термин “сшитый пептид” или “прошитый пептид” в настоящем изобретении означает искусственно модифицированный пептид, у которого вторичная структура пептида стабилизирована с помощью одной или нескольких искусственных молекулярных сшивок (мостиков), соединяющих соседние витки α -спиралей в пептиде. Методы получения сшитых пептидов хорошо известны в данной области, например, в Verdine & Hilinski (2012, *Methods Enzymol.*, 503, 3-33), WO 10033617 и WO 10011313, содержание которых включено сюда путем ссылки.

В одном воплощении сшивки у прошитых пептидов по настоящему изобретению представляют собой сшивки типа $i+3$ и/или $i+4$ и/или $i+7$. У пептидов “сшивка $i+3$ ” означает сшивку между “ i ”-ой аминокислотой и другой аминокислотой, находящейся на расстоянии 3 аминокислотных остатков от i -ой аминокислоты. У пептидов “сшивка $i+4$ ”

означает сшивку между “i”-ой аминокислотой и другой аминокислотой, находящейся на расстоянии 4 аминокислотных остатков от i-ой аминокислоты. У пептидов “сшивка i+7” означает сшивку между “i”-ой аминокислотой и другой аминокислотой, находящейся на расстоянии 7 аминокислотных остатков от i-ой аминокислоты. В предпочтительном аспекте пептиды содержат сшивки “i+7”.

Для самых коротких последовательностей, в частности, содержащих 3-4 остатка, сшивки типа i+3 и i+4 вводятся между остатками, которые находятся вне этой последовательности. Если последовательности достаточно длинные, то предпочтительны сшивки типа i+7.

Для иллюстрации этого аспекта на одном конкретном пептиде, этот пептид может включать, в основном состоять или состоять из одной из следующих последовательностей:

VECTMXEKRVLAX (SEQ ID NO: 24)
 VECTXXEKRVLAX (SEQ ID NO: 25)
 VECTMXEKXVLAX (SEQ ID NO: 26)
 VECTXXEKXVLAX (SEQ ID NO: 27)
 VECTXXEKXVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 28)
 VECTMXEKRVLAXLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 29)
 VECTXXEKRVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 30)
 VECTMXEKXVLAXLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 31)
 VECTTXEKEVLAXLDKAAFLTQHS (SEQ ID NO: 53)
 VECTTXEKEVLAXLDKAAF (SEQ ID NO: 54)
 VEGTTXEKEVLAXLDKAAF (SEQ ID NO: 55)
 ECTTXEKEVLAXL (SEQ ID NO 56) и
 ECTMXEKKVLAXL (SEQ ID NO 57),

причем выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые остатки **X** несут сшивки и представляют собой любые производные аминокислот, подходящие для сшивания; а

X означает любую аминокислоту, кроме M, P и R, предпочтительно аминокислоту, благоприятную для вторичной структуры α -спирали, более предпочтительно выбранную из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, еще более предпочтительно A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, и

причем последовательность необязательно содержит 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот, выбранные из замен, делеций, вставок и их комбинаций.

Например, в контексте сшивки i+7 первая аминокислота X представляет собой 2-

(7-октенил)аминокислоту (к примеру, 2-(7-октенил)аланин или 2-(7-октенил)аргинин), а вторая аминокислота X представляет собой 2-(4-пентенил)аминокислоту (к примеру, 2-(4-пентенил)аланин или 2-(4-пентенил)серин). Возможные комбинации: 2-(7-октенил)аланин и 2-(4-пентенил)аланин; 2-(7-октенил)аланин и 2-(4-пентенил)серин; 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)аланин; или 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин.

В одном конкретном воплощении пептид может представлять собой:

VECTTREKEVLASLDKAAFLTQLHS (SEQ ID NO: 32),

причем R и S несут сшивку, предпочтительно это 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин, соответственно;

а последовательность необязательно содержит 1, 2, 3, 4 или 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций, более предпочтительно 1, 2 или 3 модификации аминокислот, выбранные из замен, делеций, вставок и их комбинаций.

В одном конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению являются циклическими пептидами. В настоящем изобретении термины “циклический пептид” или “кольцевой пептид” эквивалентны и относятся к пептидам, у которых N-конец и C-конец, либо N-конец и боковая цепь другой аминокислоты, предпочтительно C-концевой аминокислоты, либо C-конец и боковая цепь другой аминокислоты, предпочтительно N-концевой аминокислоты, либо боковая цепь одной аминокислоты и боковая цепь другой аминокислоты, предпочтительно N-концевой аминокислоты и C-концевой аминокислоты, соединяются ковалентной связью, образуя кольцевую структуру. В настоящем изобретении термины “N-конец”, “амино-конец”, “NH₂-конец”, “N-терминальный конец” и “аминный конец” эквивалентны и относятся к свободной аминогруппе (-NH₂), находящейся у первой аминокислоты пептида. В настоящем изобретении термины “C-конец”, “карбоксильный конец”, “карбокси-конец”, “C-терминальный конец” и “COOH-конец” эквивалентны и относятся к свободной карбоксильной группе (-COOH), находящейся у последней аминокислоты пептида.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют длину менее 80 аминокислот, более предпочтительно менее 60 аминокислот, еще более предпочтительно менее 40 аминокислот и даже еще более предпочтительно менее 30 аминокислот. В одном конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют длину менее 25 аминокислот. В другом конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют длину менее 20 аминокислот, предпочтительно менее 15 аминокислот. Предпочтительно пептиды имеют длину как минимум более 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. Например, пептиды имеют длину по меньшей

мере в 4 и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере в 4 и менее 30 аминокислот; более предпочтительно по меньшей мере в 6 аминокислот и менее 25 аминокислот.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению способны нарушать взаимодействие ALMS1-ПКС, в частности, ослаблять или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и α ПКС. Иными словами, пептиды по настоящему изобретению способны блокировать взаимодействие между ALMS1 и α ПКС. С другой стороны, пептиды по настоящему изобретению могут и не нарушать взаимодействие ALMS1-ПКС, в частности, не ослаблять или не предотвращать взаимодействие между ALMS1 и α ПКС. Иными словами, пептиды по настоящему изобретению могут и не блокировать взаимодействие между ALMS1 и α ПКС.

Для определения влияния пептида на связывание α ПКС с ALMS1 можно использовать любые технологии, известные специалистам в данной области, в частности, любые методы, пригодные для определения взаимодействий между белками. Например, рекомбинантный или очищенный нативный ALMS1 либо α ПКС можно посадить на чип для поверхностного плазмонного резонанса и пропускать через него другие молекулы для оценки сродства связывания, к примеру, на приборе Biacore (General Electric, США).

Влияние пептидов на связывание α ПКС с ALMS1 определяется путем измерения связывания α ПКС с ALMS1 в отсутствие и в присутствии исследуемого пептида и сравнения связывания α ПКС с ALMS1.

В частности, можно воспользоваться методом иммунопреципитации, используя в качестве наживки ALMS1. Анализ можно проводить на клетках, в частности адипоцитах, культивируемых в отсутствие и/или в присутствии инсулина, предпочтительно в отсутствие инсулина. Исследуемые пептиды добавляют в культуральную среду. Затем проводится иммунодетектирование α ПКС.

Под “снижением”, “уменьшением” или “предотвращением” подразумевается снижение связывания по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению со связыванием, измеренным в отсутствие исследуемой молекулы в тех же условиях.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению способны снижать экспрессию FATP2 в жировой ткани.

FATP2 также называется представителем 2 семейства 27 переносчиков веществ (SLC27A2). Этот белок представлен в базе данных UniProtKB под номером O14975. Ген описан в базе данных UniGene под номером Hs.11729. Соответствующие последовательности представлены в NCBI под номерами NP_003636.2 и NM_003645.3 для

изоформы 1 и NP_001153101.1 и NM_001159629.1 для изоформы 2.

Под “снижением” или “уменьшением” экспрессии подразумевается снижение экспрессии по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению с экспрессией, измеренной в отсутствие пептида в таких же условиях. Экспрессию можно измерить либо на уровне белка (напр., с помощью антител), либо на уровне мРНК.

Экспрессия может измеряться на уровне белка любым доступным методом типа иммуногистохимии, полуколичественного вестерн-блоттинга или с помощью белковых матриц или антител. Антитела против FATP2 коммерчески доступны, например, фирмы Origene, кат. № TA350424 или TA333990; или Santa Cruz Biotechnology, кат. № sc-393906.

Экспрессия также может измеряться на уровне мРНК любым доступным методом. Предпочтительно уровень экспрессии FATP2 определяется путем измерения количества транскриптов мРНК методом количественной ОТ-ПЦР, количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, ПЦР по технологии Nanostring или по технологии высокопроизводительного секвенирования типа RNA-Seq или по технологии секвенирования в микрофлюидных системах. Более конкретно экспрессия измеряется методом, указанным в разделе «Примеры».

В одном конкретном воплощении влияние пептидов на экспрессию FATP2 в жировой ткани предпочтительно является специфичным для FATP2. В этом воплощении пептиды могут совсем или почти не влиять на экспрессию в жировой ткани других FATP, то есть FATP1, FATP3, FATP4, FATP5 и FATP6, в частности, у млекопитающих.

В одном конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют следующие характеристики:

- они не содержат одновременно ни одного метионина, ни одного пролина и ни одного аргинина;
 - они принимают вторичную структуру, которая представляет собой спираль, предпочтительно альфа-спираль;
 - они включают, в основном состоят или состоят из последовательности одного сегмента киназного домена РКС (протеинкиназы C);
- а также имеют одну, две, три, четыре или все следующие характеристики:
- они модифицируют уровни экспрессии FATP в жировой ткани, предпочтительно снижают экспрессию FATP2 в жировой ткани;
 - они имеют длину по меньшей мере в 4 аминокислоты и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислоты и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислоты и менее 25 аминокислот;
 - они принимают вторичную структуру, которая представляет собой спираль,

предпочтительно альфа-спираль;

- они модифицированы посредством сшивки.

В одном более конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют следующие характеристики:

- они не содержат одновременно ни одного метионина, ни одного пролина и ни одного аргинина;

- они имеют длину по меньшей мере в 4 аминокислоты и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислоты и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислоты и менее 25 аминокислот;

- они принимают вторичную структуру, которая представляет собой спираль, предпочтительно альфа-спираль.

В другом более конкретном воплощении пептиды по настоящему изобретению имеют следующие характеристики:

- они снижают экспрессию FATP2 в жировой ткани;

- они не содержат одновременно ни одного метионина, ни одного пролина и ни одного аргинина;

- они имеют длину по меньшей мере в 4 аминокислоты и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислоты и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 4 аминокислоты и менее 25 аминокислот;

- они принимают вторичную структуру, которая представляет собой спираль, предпочтительно альфа-спираль.

Пептиды по настоящему изобретению могут дополнительно содержать фрагмент, облегчающий его поглощение клетками или проникновение в клетки, в частности, PTD (домен трансдукции белка). Обычно PTD содержат определенную аминокислотную последовательность из 10-20 аминокислот (Matsushita and Matsui (2005), J Mol Med 83, 324-328; Vivès et al., Biochimica et Biophysica Acta, 2008, 1786, 126-138). PTD в основном состоят из основных аминокислот типа аргинина или лизина, а репрезентативные примеры PTD включают богатые аргинином пептиды, такие как поли-R8 (RRRRRRRR, SEQ ID NO: 33) или RRPRRPRRPRRPRR (SEQ ID NO: 34), пептиды antennapedia или пенетратин типа RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 35) или HIV-Tat (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO: 36).

Пептиды по настоящему изобретению могут состоять из природных аминокислот и/или неприродных аминокислот. Термин “неприродные аминокислоты” определяется как аналоги или производные природных аминокислот (то есть аланина, валина, глицина, лейцина, изолейцина, лизина, аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, аспарагиновой

кислоты, аспарагина, гистидина, тирозина, фенилаланина, триптофана, серина, пролина, треонина, цистеина, метионина). У них имеются модифицированные боковые цепи, напр., укороченные, удлиненные или с другими функциональными группами. Предусмотрены D- и L-изомеры, в частности, потому, что D-изомеры не чувствительны к протеазам. Кроме того, также предусмотрены модификации некоторых или всех пептидных связей для повышения устойчивости к протеолизу, в частности, $(-\text{CO}-\text{NH}-)$ на $(-\text{CH}_2-\text{NH}-)$, $(-\text{NH}-\text{CO}-)$, $(-\text{CH}_2-\text{O}-)$, $(-\text{CH}_2-\text{S}-)$, $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)$, $(-\text{CO}-\text{CH}_2-)$, $(-\text{CHOH}-\text{CH}_2-)$, $(-\text{N}=\text{N}-)$ и/или $(-\text{CH}=\text{CH}-)$. Пептиды могут иметь карбоксильный $(-\text{COO}^-)$ или амидный $(-\text{CONH}_2)$ C-терминальный конец. Пептиды также могут иметь D-ретроинверсную последовательность приведенных здесь пептидов. N-конец может быть модифицирован, особенно ацетильным радикалом.

Необязательно пептиды могут быть ПЭГилированы для повышения их стабильности. Также необязательно пептиды могут входить в состав неводных растворов протонных растворителей типа пропиленгликоля и полиэтиленгликоля. Пептиды также могут быть заключены в микросферы из полимолочной-полигликолевой кислоты типа депо. Существует много систем доставки с замедленным высвобождением, и многие из них подходят для настоящего изобретения. Например, подходят полимерные композиции с замедленным высвобождением на основе разлагаемых полимеров типа PLGA, полилактата или полигликолата, а также композиции типа депо на основе липидов типа описанных в WO 2005/117830 и/или WO 2006/075124, полное содержание которых включено сюда путем ссылки. Включение активных средств в составы депо из биоразлагаемых полимеров хорошо разработано и хорошо известно в данной области, поэтому пептиды по настоящему изобретению могут быть включены в такие составы с помощью известных методов. Предпочтительно композиции по настоящему изобретению способны высвобождать пептиды при функциональной концентрации в течение по меньшей мере 1 месяца.

Под “пептидами” подразумеваются такие пептиды, как изложено выше, либо комбинации различных пептидов, как изложено выше. Например, можно использовать 2, 3, 4, 5 или 6 различных пептидов, предпочтительно 2 или 3, более предпочтительно 2.

Комбинации

Пептиды по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами, к примеру, с антидиабетическими средствами, гиполипидемическими средствами, средствами против ожирения, антигипертензивными средствами, антистеатотическими средствами, противовоспалительными средствами и агонистами рецепторов активаторов-

пролифераторов пероксисом.

Соответственно, настоящим изобретением предусмотрены:

- пептиды или фармацевтические композиции, содержащие описанные здесь пептиды, для применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами, в частности, как изложено здесь;
- фармацевтические композиции, содержащие описанные здесь пептиды и одно или несколько дополнительных активных средств для применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний;
- препараты, комбинированные препараты или наборы, содержащие пептиды по настоящему изобретению и одно или несколько дополнительных активных средств, в частности, как изложено здесь, для одновременного, раздельного или последовательного применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний;
- применение пептидов для изготовления лекарственных средств для лечения диабета и связанных с ним заболеваний в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами;
- применение описанных здесь пептидов и одного или нескольких дополнительных активных средств, в частности, как изложено здесь, для изготовления лекарственных средств для лечения диабета и связанных с ним заболеваний;
- способ лечения диабета и связанных с ним заболеваний у субъектов, включающий введение терапевтически эффективного количества описанного здесь пептида и терапевтически эффективного количества одного или нескольких дополнительных активных средств;
- способ лечения диабета и связанных с ним заболеваний у субъектов, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей описанный здесь пептид, и одного или нескольких дополнительных активных средств, в частности, как изложено здесь.

В частности, можно использовать терапевтически или субтерапевтически эффективное количество одного или нескольких дополнительных активных средств. Под “субтерапевтическим” подразумевается количество, которое может составлять, к примеру, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10% от стандартной терапевтической дозировки (в частности, при тех же показаниях и/или том же способе введения и/или частоте введения).

Антидиабетическими средствами могут быть, к примеру, инсулин, производные инсулина и его миметики; стимуляторы секреции инсулина типа сульфонилкарбамидов (напр., хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, толбутамид, глибурид, глимепирид,

глипизид); глифлозины типа эмпаглифлозина и дапаглифлозина; глибурид и амарил; лираглутид (NN2211); лиганды рецепторов инсулинотропных сульфонилкарбамидов типа меглитинидов, напр., натеглинид и репаглинид; тиазолидиндионы (напр., росиглитазон (Avandia), троглитазон (Rezulin), пиоглитазон (Actos), балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, троглитазон, энглитазон, циглитазон, адаглитазон, дарглитазон), которые усиливают действие инсулина, напр., путем сенсibilизации к инсулину, тем самым усиливая утилизацию глюкозы в периферических тканях; ингибиторы тирозиновой протеинфосфатазы IB (PTP-1B) типа PTP-112; ингибиторы белка-переносчика холестерилэфиров (CETP) типа торцетрапиба; ингибиторы GSK3 (киназы-3 гликогенсинтазы), такие как SB-517955, SB-4195052, SB-216763, NN-57-05441 и NN-57-05445; лиганды RXR типа GW-0791 и AGN-194204; ингибиторы натрийзависимого котранспортера глюкозы типа T-1095 или канаглифлозина; ингибиторы гликогенфосфорилазы A типа BAY R3401; бигуаниды типа метформина и другие средства, которые действуют, усиливая утилизацию глюкозы, снижая продукцию глюкозы в печени и/или уменьшая выработку глюкозы в кишечнике; ингибиторы α -глюкозидазы типа акарбозы и миглитола и другие средства, замедляющие расщепление углеводов и тем самым всасывание их из кишечника и снижающие гипергликемию после приема пищи; GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1), аналоги GLP-1 типа эксендина-4 и миметики GLP-1; и ингибиторы DPP-IV (дипептидилпептидазы IV) типа вилдаглиптина. Им также может быть антидиабетическое средство, описанное в Expert Opin Investig Drugs 2003, 12(4): 623-633, фиг. 1-7. Антидиабетические средства также могут включать молекулу, предотвращающую связывание α PKC и ALMS1, типа описанной в WO 2015/114062, содержание которого включено сюда путем ссылки.

Гиполипидемическими средствами могут быть, к примеру, ингибиторы редуктазы 3-гидрокси-3-метил-глутарил-кофермента A (HMG-CoA), напр., ловастатин, питавастатин, симвастатин, правастатин, церивастатин, мевастатин, велостатин, флувастатин, далвастатин, аторвастатин, росувастатин и ривастатин; ингибиторы скваленсинтазы; лиганды FXR (X-рецептора фарнезоидов) и LXR (печеночного X-рецептора) типа обетихоловой кислоты; секвестранты желчных кислот типа холестирамина и колесевелама; фибраты; никотиновая кислота и аспирин; арамхол, агонист трансмембранного G-белкового рецептора (TGR) 5.

Средствами против ожирения могут быть, к примеру, орлистат, римонабант, фентермин, топирамат, кнекса (qпеха) и локасерин.

Антигипертензивными средствами могут быть, к примеру, петлевые диуретики типа этакриновой кислоты, фуросемида и торсемида; ингибиторы

ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), такие как беназеприл, каптоприл, эналаприл, фосиноприл, лизиноприл, мозексиприл, перинодоприл, квинаприл, рамиприл и трандолаприл; ингибиторы мембранного насоса Na-K-АТФазы типа дигоксина; ингибиторы нейтральной эндопептидазы (NEP) типа сакубитрила; ингибиторы АСЕ/NEP типа омапатрилата, сакпатрилата и фасидотрила; антагонисты ангиотензина II, такие как кандесартан, эпросартан, ирбесартан, лосартан, телмисартан и валсартан, в особенности валсартан; комбинации ингибиторов NEP и антагонистов ангиотензина II типа сакубитрила и валсартана (т.е. Entresto); ингибиторы ренина, такие как дитекирен, занкирен, терлакирен, алискирен, RO 66-1132 и RO-66-1168; блокаторы β -адренергических рецепторов, такие как ацебутолол, атенолол, бетаксолол, бисопролол, метопролол, надолол, пропранолол, соталол и тимолол; инотропные средства типа дигоксина, добутамина и милринона; блокаторы кальциевых каналов, такие как амлодипин, бепридил, дилтиазем, фелодипин, никардипин, нимодипин, нифедипин, нисолдипин и верапамил; антагонисты альдостероновых рецепторов; и ингибиторы альдостеронсинтазы.

Агонистами рецепторов активаторов-пролифераторов пероксисом могут быть, к примеру, фенофибрат, пиоглитазон, росиглитазон, тесаглитазар, BMS-298585, L-796449, соединения, специально описанные в патентной заявке WO 2004/103995, т.е. соединения из примеров 1-35 или соединения, специально перечисленные в пункте 21, или же соединения, специально описанные в патентной заявке WO 03/043985, т.е. соединения из примеров 1-7 или соединения, специально перечисленные в пункте 19, в особенности (R)-1-{4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)оксазол-4-илметокси]бензолсульфонил}-2,3-дигидро-1H-индол-2-карбоновая кислота или её соли.

Другими представляющими интерес средствами могут быть, к примеру, цениквивирок, симтузумаб, селонсертиб, эмрикасан.

В одном конкретном воплощении одно или несколько дополнительных активных средств, используемых в комбинации с пептидами, можно выбрать среди аналогов GLP-1 типа лираглутида, обетихолеовой кислоты, глифлозина, симтузумаба (GS 6624), цениквивирока, арамхола, ингибиторов галектина 3 типа GR-MD-02, агонистов TGR5 и двойных агонистов FXR/TGR5 типа INT-777 или INT-767 и эмрикасана.

Противовоспалительными средствами могут быть любые средства, известные специалистам, как-то нестероидные противовоспалительные средства (NSAIDs), включая салициловую кислоту, ибупрофен в его различных формах и напроксен в его различных формах, стероидные противовоспалительные средства типа кортикостероидов, противовоспалительные антитела против TNF- α и их комбинации.

Форма фармацевтических композиций, способ введения, дозировка и режим, естественно, зависят от подлежащего лечению заболевания, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента и т.п.

Фармацевтические или терапевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутриглазного введения и т.п.

Пептиды, используемые в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, присутствуют в терапевтически эффективном количестве.

Фармацевтические композиции, содержащие пептиды, состояются в соответствии со стандартной фармацевтической практикой (Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and JC Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York), известной специалистам в данной области.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены стабильные формы для парентерального введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению, содержащих пептиды либо их соли, причем пептиды были высушены, а затем их восстанавливают в растворителе перед применением. Пептид (или в тех воплощениях, где состав содержит два или несколько пептидов – каждый из пептидов) смешивают с нелетучим буфером и высушивают до сухого пептидного порошка. Подходящие буферы включают, без ограничения, глициновые буферы, цитратные буферы, фосфатные буферы и их смеси. В одном воплощении буфером является глициновый буфер. В другом воплощении буфером является смесь цитратного буфера и фосфатного буфера. В некоторых воплощениях, в которых состав содержит два или несколько пептидов, первый и второй буфер одинаковы. В некоторых воплощениях, в которых состав содержит два или несколько пептидов, первый и второй буфер различны. С другой стороны, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут храниться в водном состоянии. Раствор может содержать, если нужно, и другие добавки или наполнители, которые должны быть совместимы с действующим началом, а если они не удаляются на стадии сублимационной сушки, то они также должны быть совместимы со способом введения. При парентеральном введении композиции могут вводиться внутривенно, подкожно, внутримышечно или внутримышечно. Предпочтительно композиции или пептиды вводятся или должны вводиться подкожно, в частности, в жировую ткань.

Предпочтительно их можно поместить в миниосмотический насос или другое устройство для контролируемой доставки, имплантированное в организм. Предпочтительно их можно смешивать с другими соединениями для получения составов с замедленным высвобождением типа депо. Предпочтительным способом введения

является подкожная инъекция, к примеру, с помощью одноразового или многокомпонентного дозирующего устройства типа инсулиновой ручки. Пептиды также можно вводить с помощью устройства, позволяющего подкожное введение без иглы, в неинвазивной системе.

Кроме того, пептиды можно вводить с помощью любой доступной системы доставки лекарств. В частности, предусмотрено использование рекомбинантного фермента гиалуронидазы человека, hHuRH20 , для обеспечения и оптимизации подкожной доставки лекарств при соответствующей комбинированной терапии.

По этой технологии некоторые биопрепараты и соединения, которые вводятся внутривенно, можно вместо этого вводить подкожно или под кожу, потенциально обеспечивая лучшие ощущения для пациентов и повышение эффективности системы здравоохранения за счет сокращения времени введения, боли при инъекции и реакций на месте введения.

В одном воплощении пептиды по настоящему изобретению можно смешивать с другими соединениями для получения состава с замедленным высвобождением типа депо. Затем их можно вводить подкожно, получая депо с замедленным высвобождением.

Для перорального введения композиции могут быть составлены в виде стандартных дозовых форм типа таблеток, капсул, порошков, гранул и жидкие препаратов типа сиропов, эликсиров и концентрированных капель. Можно использовать нетоксичные твердые носители или разбавители, которые включают, к примеру, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, талька, целлюлозы, глюкозы, сахарозы, магния, карбоната и т.п. Для прессованных таблеток также необходимы связующие, то есть вещества, придающие порошковидным материалам когезионные свойства. Например, в качестве связующих можно использовать крахмал, желатин, сахара типа лактозы или декстрозы, а также натуральные или синтетические камеди. В таблетках также необходимы разрыхлители, облегчающие разрушение таблеток. Разрыхлители включают крахмалы, глины, целлюлозы, альгины, камеди и сшитые полимеры. Кроме того, в таблетки также включают смазывающие и скользящие вещества для предотвращения прилипания материала таблеток к поверхностям в процессе производства и для улучшения текучести порошкового материала во время производства. В качестве скользящего вещества чаще всего используется коллоидный диоксид кремния, а в качестве смазывающих веществ чаще всего используются такие соединения, как тальк или стеариновая кислота.

Для трансдермального введения композиции могут быть составлены в виде мази, крема или геля, а для облегчения проникновения можно использовать соответствующие

пенетранты или детергенты типа диметилсульфоксида, диметилацетамида и диметилформамида.

Для трансмукозального введения можно использовать назальные распылители, внутрилегочные ингаляции, ректальные или вагинальные свечи. В одном воплощении изобретения можно вводить внутрилегочным способом, используя либо сухие порошки, либо жидкие препараты, вводимые с помощью устройства для внутрилегочной доставки лекарств в соответствии с методами, известными в данной области. Активное соединение можно включать в любые из известных основ свечей способами, известными в данной области. Примеры таких основ включают масло какао, полиэтиленгликоли (карбоваксы), моностеарат полиэтиленсорбитана и их смеси с другими совместимыми материалами для изменения точки плавления или скорости растворения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для высвобождения активного средства практически сразу после введения или в любое заранее определенное время или период времени после введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать один или несколько пептидов по настоящему изобретению, связанных с фармацевтически приемлемыми наполнителями и/или носителями. Эти наполнители и/или носители выбирают в соответствии со способом введения, как описано выше.

В одном конкретном воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат от 0,01 нг до 10 г пептида по настоящему изобретению. В одном воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат от 0,1 нг до 1 г пептида по настоящему изобретению.

Все ссылки, приведенные в этой заявке, включая научные статьи и рефераты, опубликованные заявки на патенты, выданные патенты или любые другие ссылки, полностью включены сюда путем ссылки, что включает все результаты, таблицы, фигуры и тексты этих ссылок.

Хотя они имеют разные значения, термины “включающий”, “имеющий”, “состоящий из” и “содержащий” могут заменять друг друга во всей заявке.

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения будут описаны в следующих примерах, которые следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничительные.

Примеры

Пример 1. Влияние пептида ADPIF/PATAS на всасывание глюкозы в первичных зрелых адипоцитах человека

Первичные преадипоциты человека культивировали в 96-луночной планшете и

дифференцировали в зрелые адипоциты человека. Через 3 недели в культуре после адипогенеза адипоциты инкубировали в культуральной среде без инсулина в течение 2 часов. После этих 2 часов инсулинового голодания среду меняли обратно либо на среду без инсулина (-INS), либо на среду с инсулином (+ INS), либо на среду с ADPIF (PATAS) на 30 минут вместе с 2-DG, аналогом глюкозы, используемым для определения поглощения глюкозы в наборе Abscam. Затем, следуя методике производителя, измеряли поглощение глюкозы в 8 лунках на каждое условие и вычисляли средние значения, которые затем наносили на гистограмму со стандартной ошибкой среднего в виде планок погрешностей, приведенных на фиг. 1.

Пример 2. Пептид ADPIF/PATAS более активно предотвращает гипергликемию, чем пептид PATAD

Мышам вводили разовую дозу (25 мкг на мышь) либо беспорядочного пептида, либо PATAD, либо ADPIF/PATAS. Представлены результаты, полученные в серии тестов на переносимость глюкозы (ipGTT) у самцов мышей DIO с непереносимостью глюкозы (фиг. 2A и 2B).

Пример 3. Пептид ADPIF/PATAS повышает активность киназы PKC в адипоцитах человека с эффектом доза-ответ

Как видно из фиг. 3, наблюдается повышение активности PKC с возрастанием количества ADPIF/PATAS, достигая близких уровней активности PKC при 25 мкг PATAS на лунку по сравнению с инсулином.

Также тестировали два других пептида из альфа-PKC, а именно ECTMVEKKVLALL и SVEWWAYGLLYEMLA, на их влияние на активность киназы PKC. Как видно из фиг. 1, оба пептида способны повышать активность киназы PKC в адипоцитах человека.

Кроме того, определяли влияние этих двух пептидов на экспрессию FATP1-6, и оба пептида снижали экспрессию FATP2 в адипоцитах (фиг. 2).

Пример 4. Эффект пептида ADPIF/PATAS на общепринятой модели диабета у мышей (db/db; самцы мышей BKS)

Как видно из фиг. 6A, пептид ADPIF/PATAS способен предотвращать гипергликемию. Кроме того, на этой модели определяли эффект пептида ADPIF/PATAS на экспрессию FATP1-6 в адипоцитах. Пептид ADPIF/PATAS способен снижать экспрессию FATP2 (фиг. 6B).

Эффект PATAS/ADPIF проверяли на модели диабета у мышей db/db на генетическом фоне BKS. 6-недельным мышам на обычном корме подкожно вводили носитель – физиологический раствор либо вводили PATAS по 2 мг/кг массы тела, а через 4 дня при

ipGTT проявлялось значительное улучшение непереносимости глюкозы в ответ на введение PATAS/ADPIF (фиг. 6A). Мышам еженедельно вводили PATAS/ADPIF или носитель еще 3 недели, после чего они еще 4 недели были без обработки при постоянном наблюдении. Затем мышей db/db забивали и измеряли уровни экспрессии изоформ белка транспорта жирных кислот (FATPs) в жировой ткани, проявляющие специфическое и значительное падение уровня экспрессии FATP2 у обработанных PATAS мышей (фиг. 6B) по сравнению с контрольными мышами.

Пример 5. Эффект пептида ADPIF/PATAS на модели синдрома Барде-Бидла (BBS)

На модели с нокаутом гена BBS10 ($Bbs10^{-/-}$) получали мышей, которые спонтанно становились тучными, как описано в литературе. В 4-месячном возрасте у $Bbs10^{-/-}$ проводили тест на переносимость глюкозы внутрибрюшинно (ipGTT) перед введением PATAS/ADPIF и обнаружили, что мыши $Bbs10^{-/-}$ не переносят глюкозу (фиг. 7) при соответствующей площади под кривой (AUC) ~ 30000 мг/дл·мин. Тем же мышам подкожно вводили по 2 мг/кг массы тела PATAS в жировую ткань, а через 3 дня проводили ipGTT и обнаружили, что мыши $Bbs10^{-/-}$ проявляют улучшение переносимости глюкозы (фиг. 7), соответствующее падению AUC до ~ 16000 мг/дл·мин.

Пример 6. ADPIF/PATAS эффективно снижает гликированный альбумин на модели у мышей STAMt после 5 недель еженедельного введения по 25 мкг ADPIF/PATAS на мышь

Гликированный альбумин – общепризнанный и надежный параметр для определения эпизодов гипергликемии *in vivo*. Поэтому использовали плазму мышей STAMT, которым 5 недель еженедельно вводили ADPIF/PATAS по 25 мкг, для сравнения с контрольными группами, получавшими физраствор. Отмечалось значительное снижение гликированного альбумина у мышей, получавших ADPIF/PATAS, свидетельствующее о том, что ADPIF/PATAS способен уменьшать гипергликемию (фиг. 8).

Материалы и методы

Последовательности пептидов, синтез и приготовление растворов

Последовательность прошитого пептида PATAD: VECTM-[2-(4-пентенил)аланин]-EKRVL A-[2-(4-пентенил)аланин]-LDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 49).

Последовательность прошитого пептида ADPIF/PATAS: VECTTREKEVLASLDKAAFLTQLHS (SEQ ID NO: 32), причем Rи Sнесут сшивку, предпочтительно это 2-(7-октенил)аргинин и 2-(4-пентенил)серин, соответственно.

ECTMVEKKVLALL (SEQ ID NO 50), причем Mи Aнесут сшивку.

SVEWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO 51), причем Aи Mнесут сшивку.

Сшитые пептиды использовали с чистотой 95%.

Все пептиды растворяли и разбавляли в стерильном физрастворе.

Анализ поглощения глюкозы в зрелых адипоцитах человека

Приобретали белые висцеральные преадипоциты человека (кат. №: C-12732; PromoCell). Преадипоциты высевали по методике производителя и культивировали в среде для роста преадипоцитов (кат. №: C-27410; PromoCell) до слияния. Индуцировали адипогенную дифференцировку путем замены среды на среду для дифференцировки преадипоцитов (кат. №: C-27436; PromoCell) на 2 дня. После фазы дифференцировки среду окончательно заменяли на питательную среду для адипоцитов (кат. №: C-27438; PromoCell). Для культур без инсулина в базальную среду для адипоцитов (кат. №: C-2431; PromoCell) без инсулина добавляли 5 г/л дезоксиглюкозы, 8 мкг/мл d-биотина, 400 нг/мл дексаметазона. Через 3 недели после адипогенной дифференцировки культуры зрелых адипоцитов культивировали в течение 2 часов без инсулина. По прошествии этих 2 часов культуральную среду заменяли на свежую культуральную среду, содержащую аналог глюкозы (2-DG) либо без инсулина (-INS), либо с инсулином (+INS), или же без инсулина + 2,5 мкл исследуемого пептида при концентрации 10 мкг/мкл в общем конечном объеме 200 мкл. После 30-минутной инкубации клетки обрабатывали, как указано в стандартном протоколе из коммерчески доступного набора для анализа поглощения глюкозы фирмы Abcam: набор для анализа поглощения глюкозы (колориметрического) (кат. №: ab136955).

Для тестов на активность киназы PKC использовали готовые зрелые первичные адипоциты человека, происходящие из жировой ткани сальника, которые приобретали у Zenbio в формате 96-луночного либо 6-луночного планшета (кат. №: OA-1096-3 или OA-1006-3). Использовали набор для анализа активности киназы PKC (кат. №: 139437) и процедуры в соответствии с протоколом производителя.

Исследования на мышах *in vivo*

Для модели мышей с ожирением и явным диабетом 2-го типа приобретали мышей BKS (D)-Leprdb/J, инвентарный номер: 010803, у фирмы Jax Labs. Мышей с нокаутом Bbs10 получали в Institute Mouse Clinic (ICS) в Страсбурге, они были ранее описаны в литературе. У всех мышей был генетический фон C57/BL6. Всех животных содержали в помещении с регулируемой температурой и влажностью, с циклом 12 ч свет/12 ч темнота. Мышам BKS (D)-Leprdb/J давали обычный корм (LM-485; Harlan Teklad Premier Laboratory Diets), а мышам с нокаутом Bbs давали корм с высоким содержанием жира/глюкозы и водопроводную воду *ad libitum*. Для *ipGTT* и *ipITT* мышей не кормили в течение 6 часов перед началом эксперимента. Инсулин 0,75 ед./кг вводили внутривенно через хвостовую вену. Пробы крови на глюкозу брали из хвоста. Мышей забивали смещением шейных позвонков.

Для исследования мышей без ожирения на модели STAM получали мышей C57/

BL6 (14-дневные беременные самки) у фирмы Japan SLC, Inc. (Япония). Всех животных, используемых в исследовании, содержали и ухаживали за ними в соответствии с Рекомендациями Японского фармакологического общества по использованию животных. Животных содержали в помещении SPF в условиях контролируемой температуры ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), влажности ($45 \pm 10\%$), освещения (12-часовые циклы искусственного освещения и темноты; свет с 8:00 до 20:00) и воздухообмена. Животных содержали в клетках TPX (CLEA Japan) максимум по 3 мыши на клетку. В качестве подстилки использовали стерилизованную бумагу Paper-Clean (Japan SLC), которую меняли раз в неделю. Им давали стерилизованный корм 60% HFD ad libitum, который помещали в металлическую крышку на клетке. Они получали чистую воду ad libitum из бутылки с водой, снабженной резиновой пробкой и трубкой-сиппером. Бутылки с водой меняли раз в неделю, чистили, стерилизовали в автоклаве и использовали повторно.

Мышей идентифицировали по биркам в ушах. Каждую клетку помечали специальным идентификационным кодом. У 12 мышей-самцов индуцировали неалкогольный стеатогепатит (NASH) посредством однократной подкожной инъекции раствора с 200 мкг стрептозотоцина (STZ, Sigma-Aldrich, США) через 2 дня после рождения и кормления диетой с высоким содержанием жира (HFD, 57 ккал% жира, кат. № HFD32, CLEA Japan, Inc., Япония) с 4-недельного возраста.

Схема дозирования пептидов для мышей BKS (D)-Leprdb/J и мышей с нокаутом Bbs10

В день 0 всех мышей не кормили утром в течение 4 часов. В 13:00 контрольные мыши получали одну инъекцию $10 \times (\text{масса тела в граммах})$ мкл 22% раствора глюкозы (в забрюшинный жир/подкожная инъекция). Обработанным мышам вводили по 25 мкг (2,5 мкл маточного раствора) исследуемого пептида, растворенного в $10 \times (\text{масса тела в граммах})$ мкл 22% раствора глюкозы. Через каждые 30 мин измеряли уровни глюкозы в крови из хвостовой вены и наносили на график, чтобы определить влияние различных обработок на площадь под кривой.

Схема дозирования пептидов для мышей на модели STAM

Для исследования использовали пептид ADPIF/PATAS, как описано выше.

Способ введения пептида

Пептид вводили подкожно в жировую ткань в объеме 100 мкл на мышь.

Схема экспериментов и обработки

Группы в исследовании

Группа 1. Пептид ADPIF/PATAS

Шести мышам с NASH подкожно в жировую ткань вводили носитель с

добавлением пептида ADPIF/PATAS в дозе 25 мкг на мышь один раз в неделю в возрасте от 4 до 9 недель.

Группа 2. Носитель

Шести мышам с NASH подкожно в жировую ткань вводили носитель [DMSO в физрастворе] в объеме 100 мкл на мышь один раз в неделю в возрасте от 4 до 9 недель.

В приведенной ниже таблице изложена схема обработки.

Группа	Кол-во мышей	Мыши	Исслед. вещество	Доза (мкг на мышь)	Объем (мкл на мышь)	Схема	Забой (нед.)
1	6	STAM	пептид	25	100	п/к, раз в нед., с 4 по 9 нед.	9
2	6	STAM	носитель	-	100	п/к, раз в нед., с 4 по 9 нед.	9

Уровни экспрессии FATP

Выделяли тотальную РНК из различных тканей и клеток с помощью набора RiboPure™ (кат. №: AM1924; Ambion) с последующей обработкой ДНКазой с помощью набора TURBO DNA-free™ (кат. №: AM 1907; Ambion). Целостность РНК определяли методом гель-электрофореза, а концентрацию РНК – на Eppendorf Biophotometer Plus с лотком Hellma® Tray Cell (кат. №: 105.810-uvs; Hellma). Обратную транскрипцию 1 мкг тотальной РНК в кДНК проводили с помощью набора для синтеза кДНК BioRad iScript™ (кат. №: 170-8891; BioRad). Амплификацию методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени проводили на установке BioRad CFX96™ Real-Time System, используя смесь iQ™ SYBR® Green Supermix (кат. №: 170-8886; BioRad) и наборы праймеров, оптимизированных для исследуемых мишеней при ПЦР в режиме реального времени на основе SYBR Green для ПЦР в режиме реального времени. Для человеческих праймеров все используемые праймеры для кПЦР приобретали из проверенных на фирме BioRad наборов праймеров MIQE.

Название гена	Название праймера	Последовательность праймера	Размер полосы при ПЦР
Fatp1	Mu_Slc27a1-RT-ex3F	TGCTTTGGTTTCTGGGACTT (SEQ ID NO 37)	156 п.н.
	Mu_Slc27a1-RT-ex4R	GCTCTAGCCGAACACGAATC (SEQ ID NO 38)	
Fatp2	Mu_Slc27a2-RT-ex4F	TGGACAAAGTAGACGGAGTGTC (SEQ ID NO 39)	165 п.н.
	Mu_Slc27a2-RT-ex5R	TAGCAAGGCCTGTCCCATAC (SEQ ID NO 40)	
Fatp3	Mu_Slc27a3-RT-ex9F	TGAGAACTTGCCACCGTATG (SEQ ID NO 41)	171 п.н.
	Mu_Slc27a3-RT-ex10R	GGCAGGTAGGCCCTATATC (SEQ ID NO 42)	
Fatp4	Mu_Slc27a4-RT-ex2F	GTTCATCCGGTCTTCATC (SEQ ID NO 43)	184 п.н.
	Mu_Slc27a4-RT-ex3R	GTGTCTGTGCCCTCGAAAAT (SEQ ID NO 44)	

Fatp5	Mu_Slc27a5-RT-ex4F	AAGTTCTCTGCCTCCCGATT (SEQ ID NO 45)	191 п.н.
	Mu_Slc27a5-RT-ex5R	CAAAGCGTTGCTGGAAGTTT (SEQ ID NO 46)	
Fatp6	Mu_Slc27a6-RT-ex1F	TCGATTCCCTCCTACACTGC (SEQ ID NO 47)	204 п.н.
	Mu_Slc27a6-RT-ex2R	TTGGTGGTACTGGCTCATCA (SEQ ID NO 48)	

Измерения по биохимии плазмы

Получение образцов

Получали образцы плазмы и хранили при -80°C для анализа. Затем плазму этих мышей использовали для измерения уровней гликированного альбумина с помощью коммерчески доступного набора фирмы LS Bio: Mouse Glycated Albumin ELISA Kit (Sandwich ELISA) - LS-F28697 в Страсбурге.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили по t-критерию Стьюдента на GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Предполагалась тенденция или тренд, когда односторонний t-критерий давал значения $p < 0,1$. Результаты выражали в виде среднего значения $\pm$ SD.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид для применения при лечении диабета и связанных с ним заболеваний, выбранных из группы, состоящей из диабета I типа, диабета II типа, инсулинорезистентности, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, гипергликемии, ожирения, гиперинсулинемии и синдрома Барде-Бидла, причем:

- пептид способен специфически снижать экспрессию FATP2 в жировой ткани;
- пептид одновременно не содержит ни одного метионина, ни одного пролина и ни одного аргинина;
- пептид принимает вторичную структуру, которая представляет собой спираль, предпочтительно альфа-спираль;
- пептид содержит по меньшей мере 5 последовательных остатков киназного домена α PKC (альфа-протеинкиназы C);
- пептид имеет длину от 5 до 60 аминокислот; и
- последовательность пептида может содержать от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций в данной последовательности сегмента киназного домена PKC.

2. Пептид для применения по п. 1, при этом пептид модифицирован посредством химической сшивки.

3. Пептид для применения по п. 1 или 2, при этом пептид имеет длину по меньшей мере в 5 аминокислот и менее 40 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 30 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислот и менее 25 аминокислот.

4. Пептид для применения по любому из пп. 1-3, при этом пептид способен ослаблять или предотвращать взаимодействие между ALMS1 и α PKC.

5. Пептид для применения по любому из пп. 1-4, при этом последовательность пептида включает одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LMYNIQQV (SEQ ID NO: 4), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций

аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GERDVRE (SEQ ID NO: 8), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVRE (SEQ ID NO: 15), необязательно содержащую от 1 до 3 замен, делеций, вставок или их комбинаций; GERDVXE (SEQ ID NO: 16), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; GEXDVXE (SEQ ID NO: 17), необязательно содержащую от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; LDN; AFF; PDY; XDY; PEI (SEQ ID NO: 5); XEI (SEQ ID NO: 18); PAK; XAK; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

6. Пептид для применения по п. 5, при этом последовательность пептида включает одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13), необязательно содержащую от 1 до 5 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; или SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52), необязательно содержащую от 1 до 5

модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

7. Пептид для применения по любому из пп. 1-4, при этом последовательность пептида включает одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); LMYHIQQV (SEQ ID NO: 4); LXYHIQQV (SEQ ID NO: 12); SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); EDEDELFSIME (SEQ ID NO: 7); EDEDELFSIXE (SEQ ID NO: 14); GERDVRE (SEQ ID NO: 8); GEXDVRE (SEQ ID NO: 15); GERDVXE (SEQ ID NO: 16); GEXDVXE (SEQ ID NO: 17); где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

8. Пептид для применения по п. 7, при этом последовательность пептида включает одну из следующих последовательностей: VECTMVEKRVLA (SEQ ID NO: 3); VECTXVEKRVLA (SEQ ID NO: 9); VECTMVEKXVLA (SEQ ID NO: 10); VECTXVEKXVLA (SEQ ID NO: 11); SVDWWAYGVLLYEMLA (SEQ ID NO: 6); SVDWWAYGVLLYEXLA (SEQ ID NO: 13); или SVXWWAYGLLYEMLA (SEQ ID NO: 52); где X – любая аминокислота, кроме M, P и R.

9. Пептид для применения по любому из пп. 1-4, при этом последовательность пептида включает, в основном состоит или состоит из по меньшей мере одной из следующих последовательностей:

a) VECTXVEKXVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 20), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

b) VECTMVEKRVLALLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 21), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

c) VECTXVEKRVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 22), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций;

d) VECTMVEKXVLALLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 23), где X – любая аминокислота, кроме M, P и R, необязательно содержащей от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций; и

e) пептида, включающего последовательность любого сегмента из по меньшей мере от 5 до 25 последовательных остатков любой из последовательностей от a) до d).

10. Пептид для применения по любому из пп. 1-7, при этом последовательность пептида включает, в основном состоит или состоит из одной из следующих

последовательностей:

VECTM**X**EKRVL**A**X (SEQ ID NO: 24)
 VECTX**X**EKRVL**A**X (SEQ ID NO: 25)
 VECTM**X**EKXVL**A**X (SEQ ID NO: 26)
 VECTX**X**EKXVL**A**X (SEQ ID NO: 27)
 VECTX**X**EKXVL**A**XLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 28)
 VECTM**X**EKRVL**A**XLDKXXFLTQLHS (SEQ ID NO: 29)
 VECTX**X**EKRVL**A**XLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 30)
 VECTM**X**EKXVL**A**XLDKPPFLTQLHS (SEQ ID NO: 31)
 VECTT**X**EKEVL**A**XLDKAAFLTQHS (SEQ ID NO: 53)
 VECTT**X**EKEVL**A**XLDKAAF (SEQ ID NO: 54)
 VEGTT**X**EKEVL**A**XLDKAAF (SEQ ID NO: 55)
 ECTT**X**EKEVL**A**X**L** (SEQ ID NO 56) и
 ECTM**X**EKKVL**A**X**L** (SEQ ID NO 57),

причем выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые остатки **X**несут сшивку и представляют собой любые производные аминокислот, подходящие для сшивания, а **X** – любая аминокислота, кроме M, P и R;

при этом последовательность необязательно содержит от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций.

11. Пептид для применения по любому из пп. 5-8, при этом **X** – любая аминокислота, благоприятная для вторичной структуры α -спирали, или аминокислота, выбранная из группы, состоящей из A, D, N, C, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y, либо аминокислота, выбранная из группы, состоящей из A, D, N, G, Q, E, H, L, K, F, S, W и Y.

12. Пептид для применения по любому из пп. 1-11, при этом данная РКС представляет собой α РКС по SEQ ID NO: 1.

13. Пептид для применения по п. 10, при этом первый выделенный жирным шрифтом и подчеркнутый **X** означает R, а второй выделенный жирным шрифтом и подчеркнутый **X** означает S, причем данные **R**и **S**несут сшивку.

14. Пептид для применения по любому из пп. 1-13, при этом последовательность пептида включает:

VECTT**R**EKEVL**A****S**LDKAAFLTQLHS (SEQ ID NO: 32),

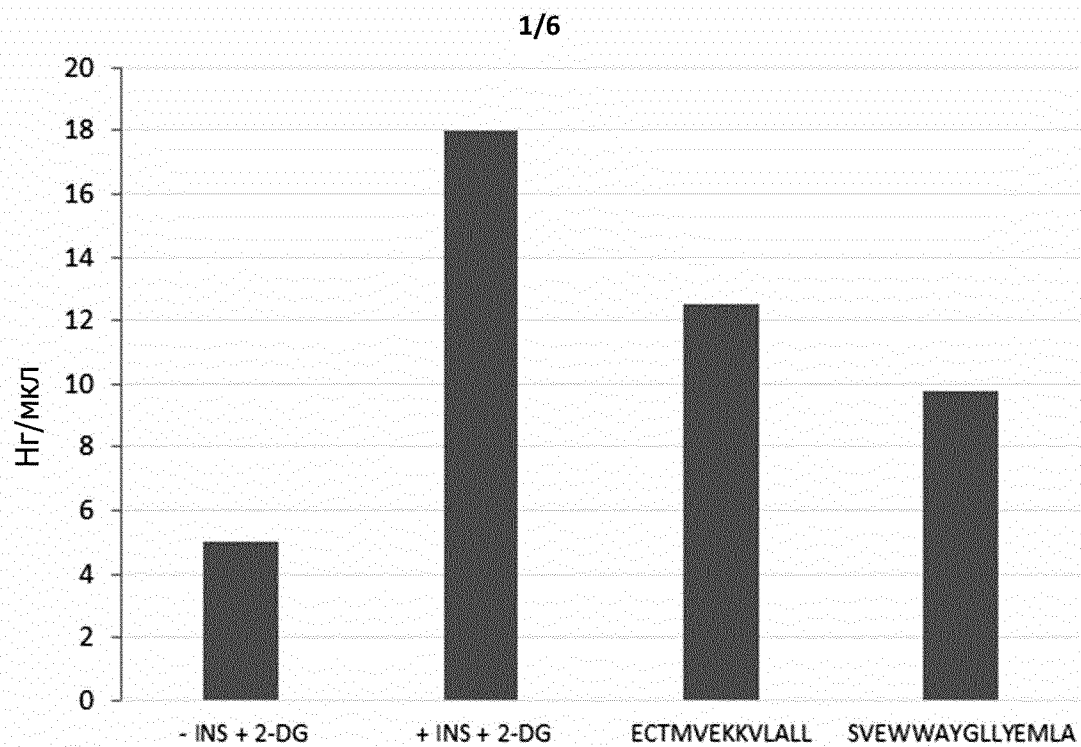
причем **R**и **S**несут сшивку,

а пептид необязательно также содержит от 1 до 5 или от 1 до 3 модификаций аминокислот, выбранных из замен, делеций, вставок и их комбинаций.

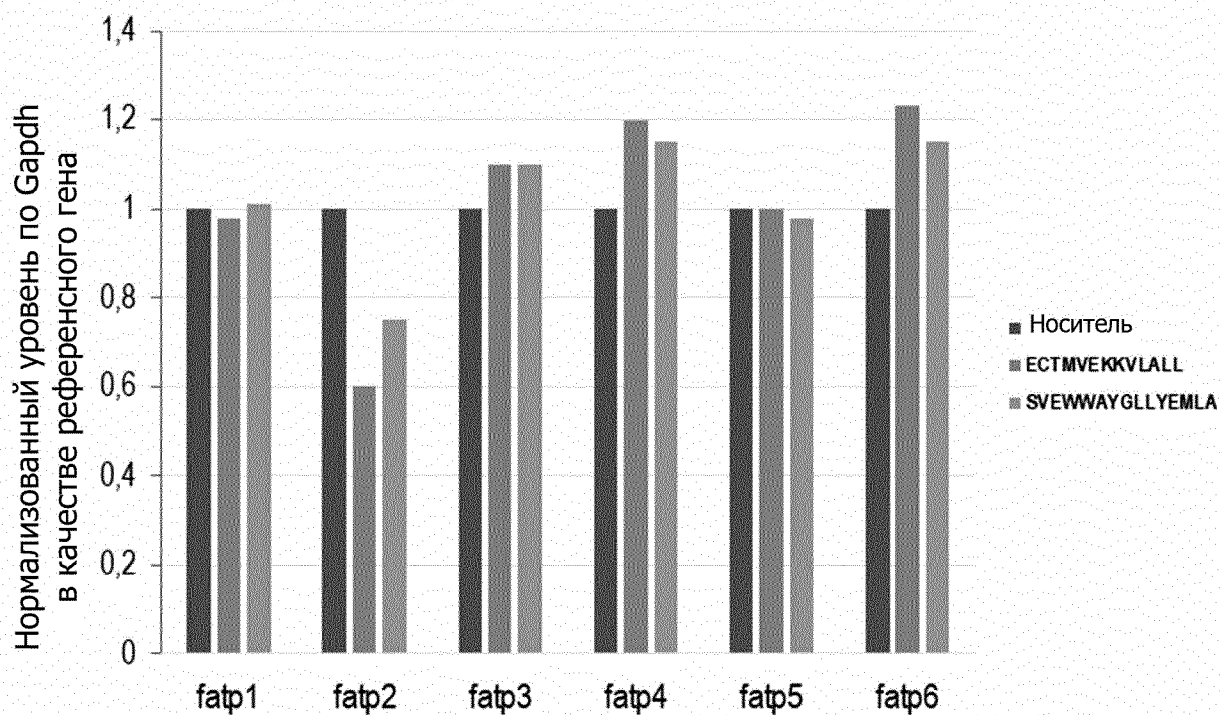
15. Пептид для применения по п. 13 или 14, содержащий 2-(7-октенил)аргинин и 2-

(4-пентенил)серин.

16. Пептид для применения по любому из пп. 1-15, при этом пептид применяется в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными средствами, предпочтительно выбранными из группы, состоящей из антидиабетических средств, гиполипидемических средств, средств против ожирения, антигипертензивных средств, антистеатотических средств, противовоспалительных средств и агонистов рецепторов активаторов-пролифераторов пероксисом.

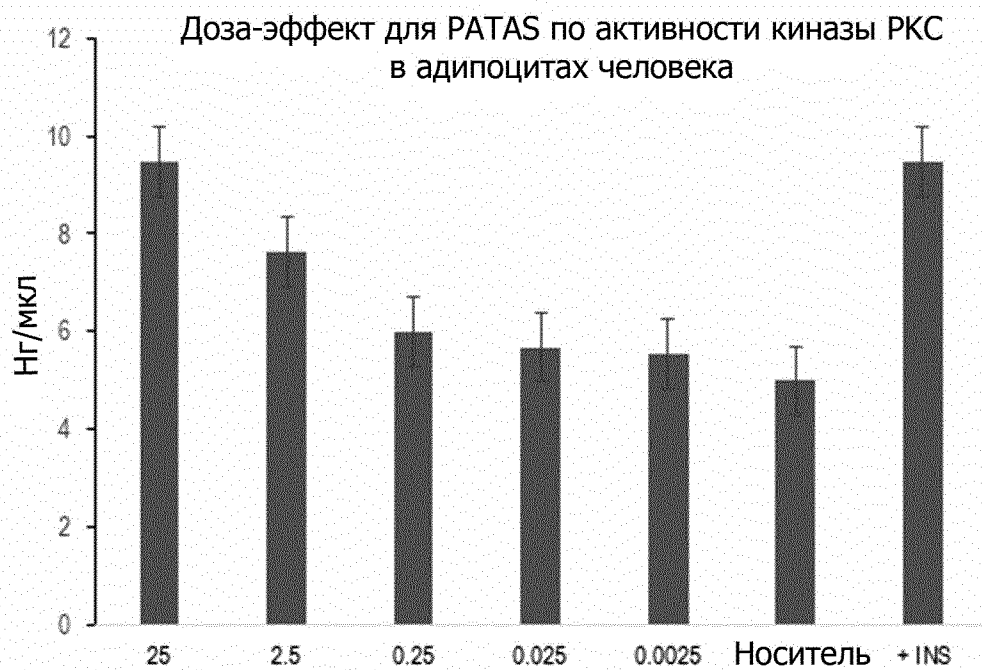


ФИГ. 1

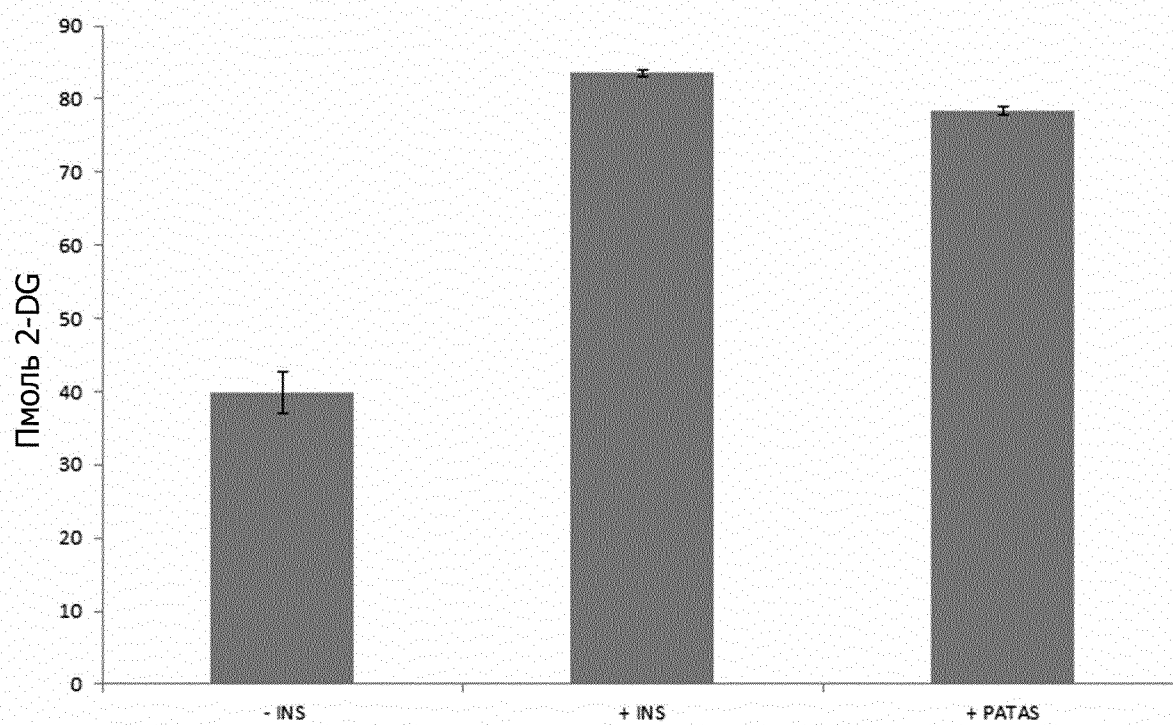


ФИГ. 2

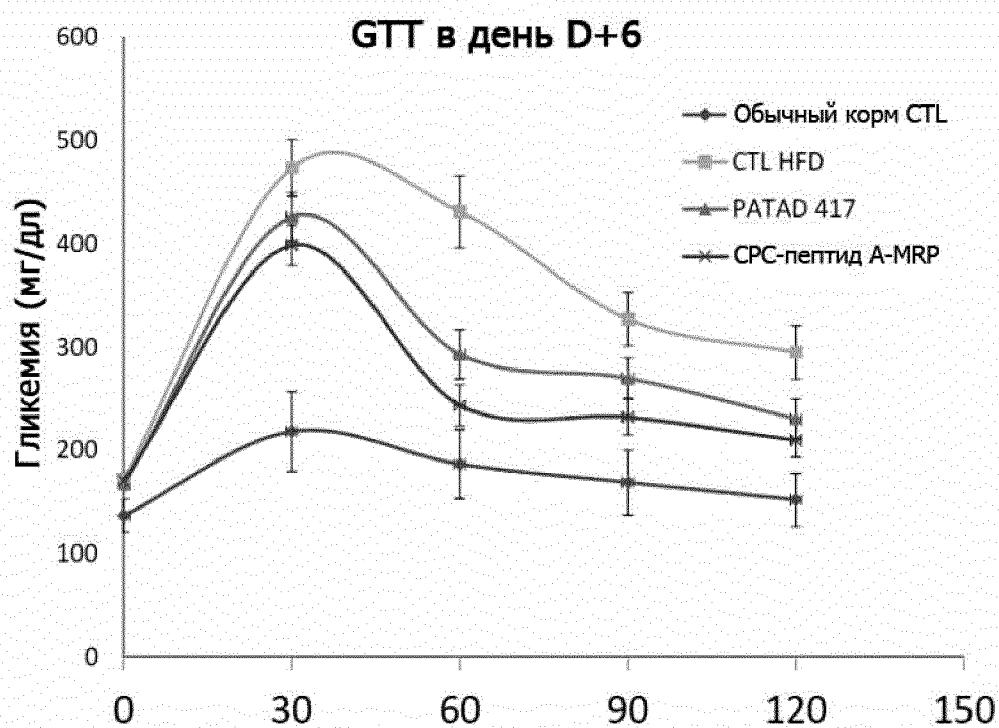
2/6



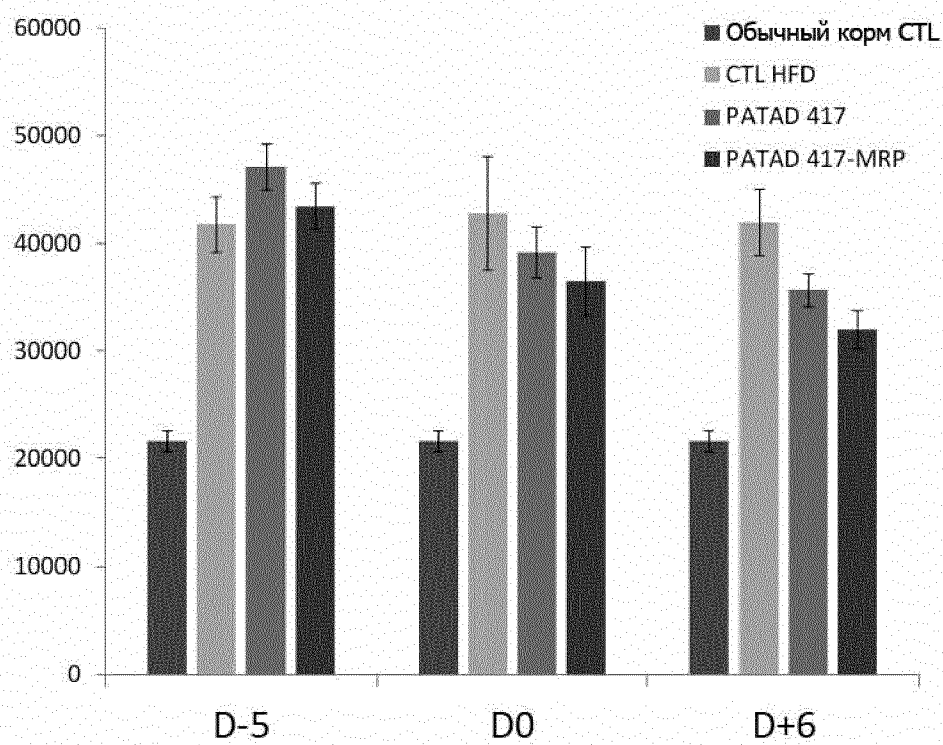
Фиг. 3



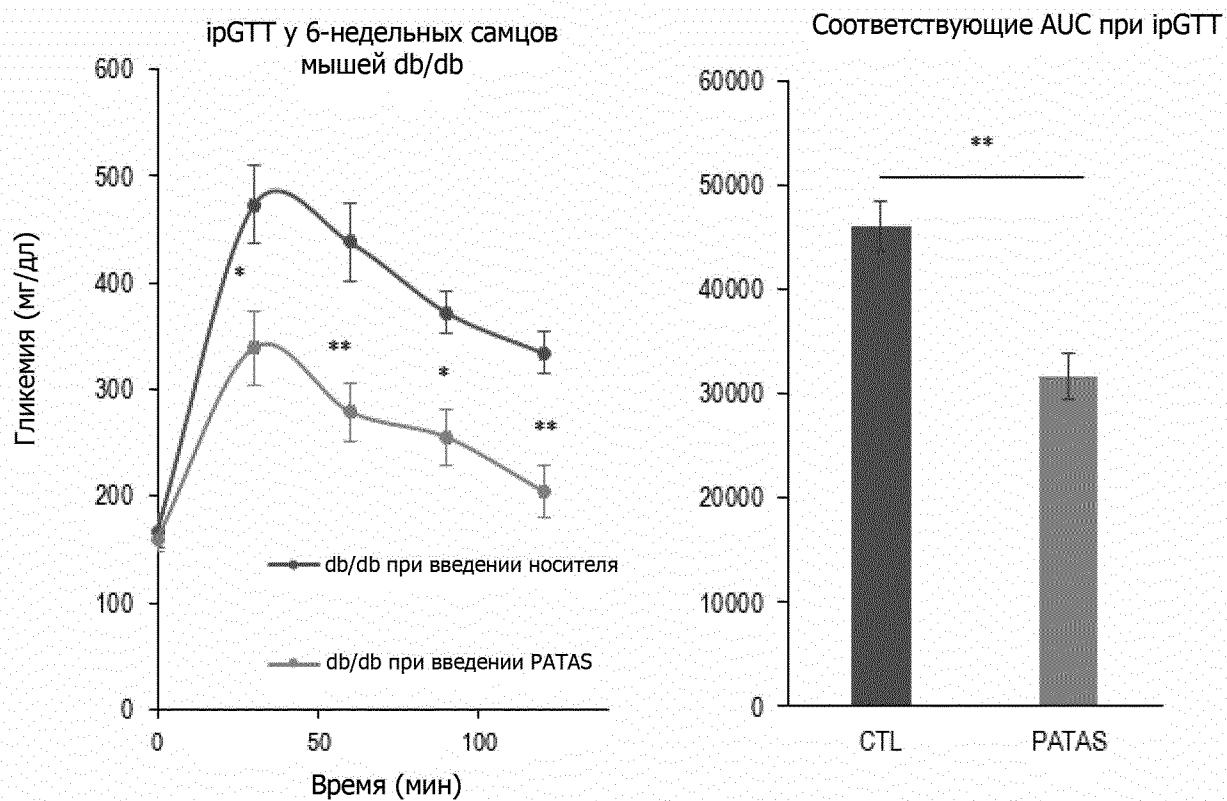
Фиг. 4



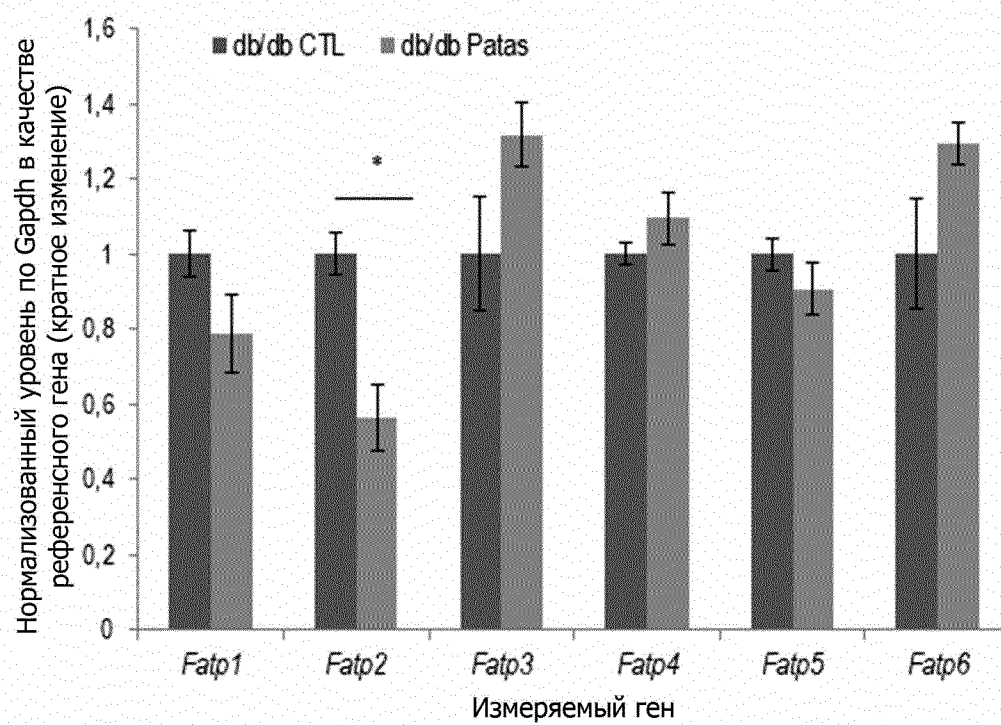
Фиг. 5А



Фиг. 5В

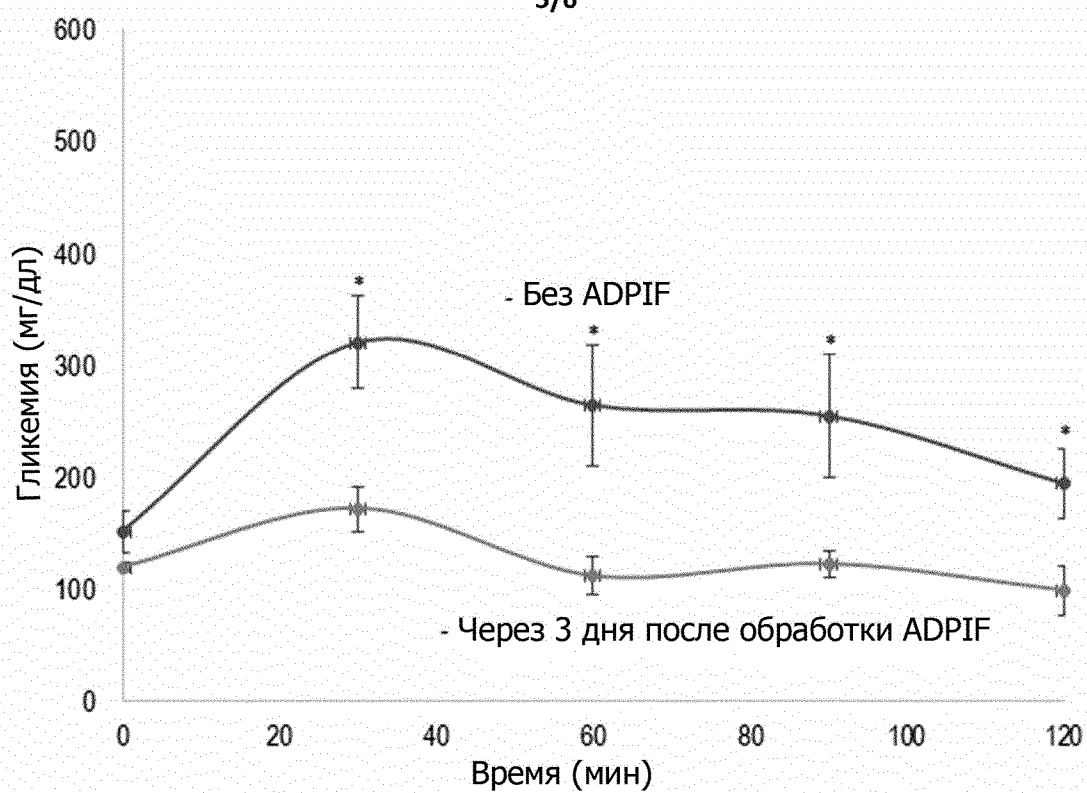


Фиг. 6А

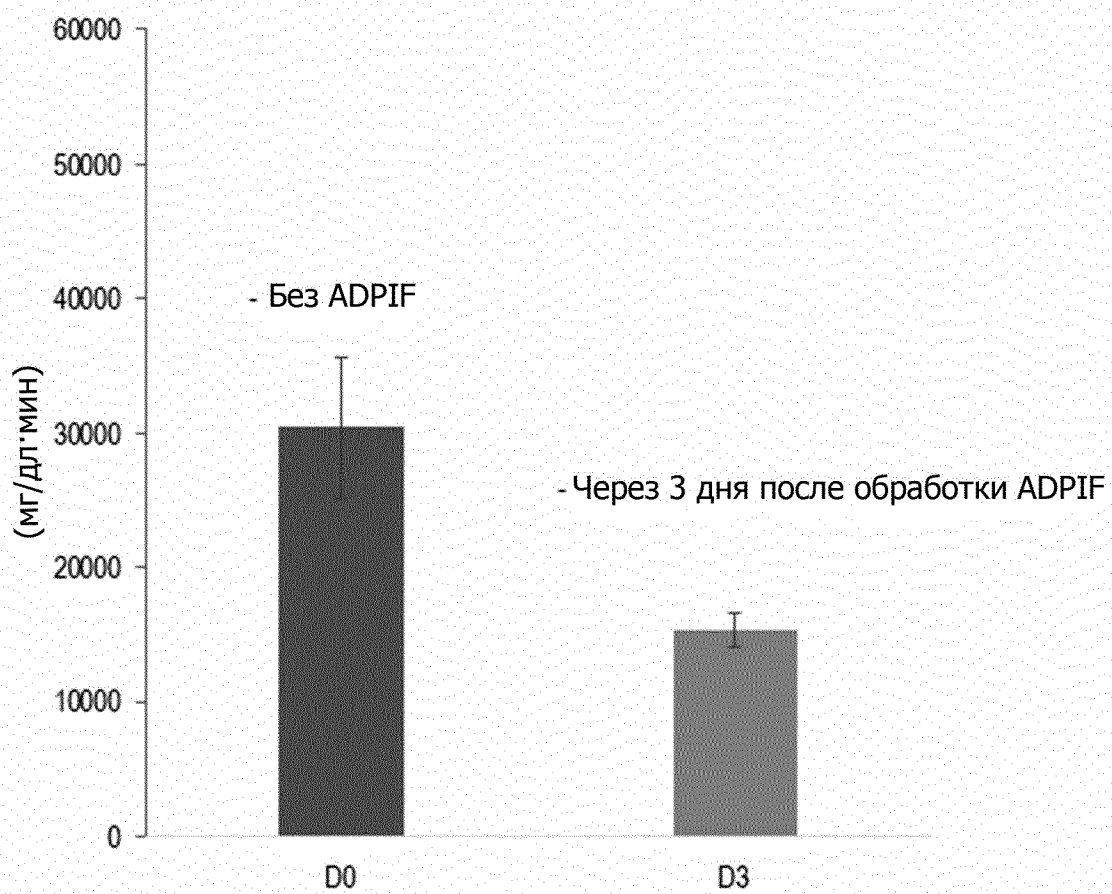


Фиг. 6В

5/6

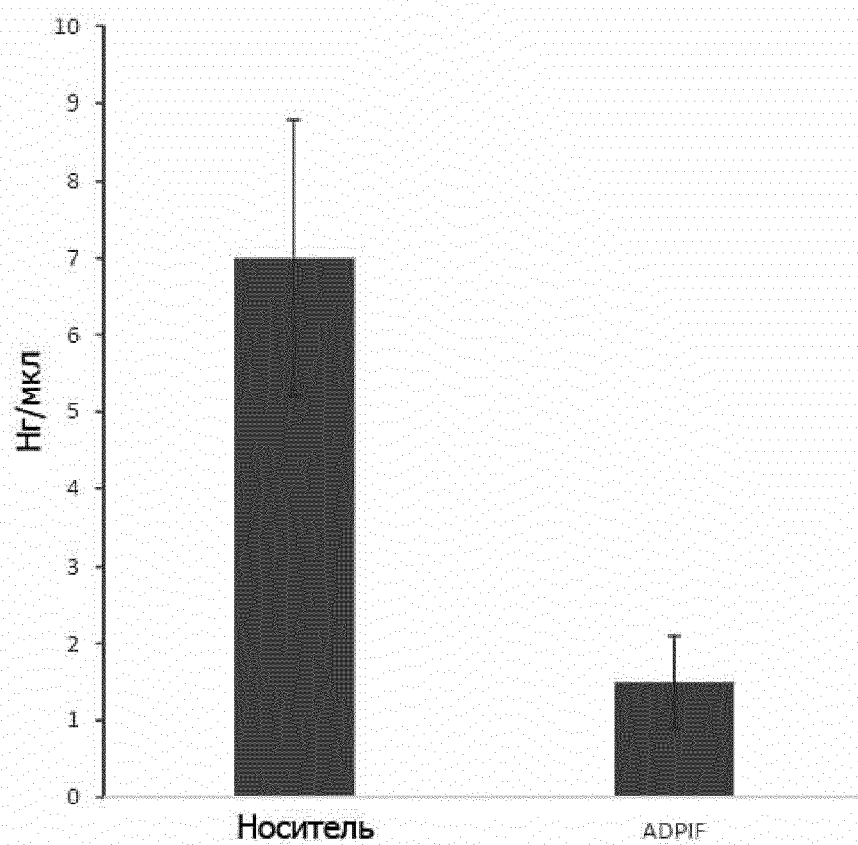


Фиг. 7А



Фиг. 7В

6/6



Фиг. 8