

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202192153 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.01

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.03.04

(54) ИНГИБИТОРЫ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 102019000003273

(72) Изобретатель:  
Мингроне Гельтруде (IT)

(32) 2019.03.06

(33) IT

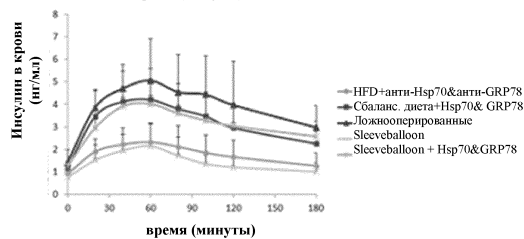
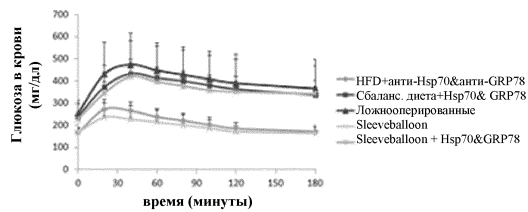
(74) Представитель:  
Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,  
Парамонова К.В. (RU)

(86) PCT/IB2020/051823

(87) WO 2020/178750 2020.09.10

(71) Заявитель:  
ДжиЭйчПи САЙЕНТИФИК  
ЛИМИТЕД (GB)

(57) Настоящее изобретение относится к ассоциации ингибиторов активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и ингибиторов активности GRP78 для применения в лечении резистентности к инсулину и/или патологий, возникающих вследствие этого клинического состояния.



A1

202192153

202192153

A1

## **Ингибиторы для терапевтического применения**

### Описание

Настоящее изобретение относится к ассоциации ингибиторов активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и ингибиторов активности белка GRP78 для применения в лечении резистентности к инсулину и/или патологий, возникающих вследствие этого клинического состояния.

### Уровень техники

Известно, что резистентность к инсулину является патологическим состоянием, возникающим, когда островки поджелудочной железы секретируют инсулин, но гормон не способен эффективно инициировать метаболическое поглощение глюкозы в метаболической ткани. Невозможность поглощения глюкозы метаболическими тканями приводит к гипогликемии и гиперинсулинемии, которые являются симптомами резистентности к инсулину. Большинство людей с резистентностью к инсулину имеют часто недиагностированную форму, хотя проверка гликемического пика позволяет выявить патологию, и отсутствие терапии может привести к развитию многочисленных патологий, для которых резистентность к инсулину является фактором риска, таких как ожирение, сердечно-сосудистые заболевания, гипертензия, диабет 2 типа и другие патологии, связанные с этой метаболической дисфункцией.

Например, во всем мире быстро растет распространенность ожирения и диабета 2 типа (T2D). Данные OMS показывают, что в 2014 году 39% мужчин и 40% женщин в возрасте  $\geq 18$  лет в Европе имели избыточный вес, и что 10-30% взрослого населения страдали ожирением. Национальное обследование состояния здоровья и питания в США на 2011-2012 годы показало, что 34,9% взрослых людей старше 20 лет, стандартизированная по возрасту величина, страдали ожирением.

Субъекты с ожирением, соблюдающие гипокалорийную диету, быстро теряют вес в течение первых 1-2 недель. Однако недавний мета-анализ и обзор литературных данных показали, что через +12 месяцев после начала изменений образа жизни, касающегося как диеты, так и физической активности, среднее снижение веса составило всего -1,56 кг (95% доверительный интервал от - от 2,27 до -0,86 кг). Это позволяет предположить, что приверженность изменениям образа жизни является низкой, и люди должны соблюдать гипокалорийную диету на протяжении всей своей жизни, что случается очень редко.

Бариатрическая хирургия является очень эффективной, так как вызывает большое снижение веса, а также поддерживает снижение веса. Более того, бариатрическая хирургия вызывает ремиссию диабета или по меньшей мере улучшает гликемический контроль, даже в долгосрочной перспективе. Однако в действительности операция предлагается лишь незначительному числу пациентов, составляющему приблизительно 1%, допускаемых к проведению бариатрической операции.

Обход двенадцатиперстной кишки, полученный с помощью Endobarrier или даже кратковременная инфузия питательных веществ через эндоскопически введенный питательный зонд, который обходит транзит через двенадцатиперстную кишку и часть тощей кишки, значительно улучшает чувствительность к инсулину и снижает гликемию у пациентов с ожирением, имеющих T2D.

Двенадцатиперстная кишка и тощая кишка продуцируют белки теплового шока (HSP), которые еще несколько лет назад считались выполняющими только функцию внутриклеточного транспорта белков. Вместо этого, в течение последних нескольких лет в литературе отмечалось, что белки теплового шока (HSP) также могут секретироваться и, следовательно, обнаруживаются в кровотоке. Однако их функция остается неясной, и имеющиеся в литературе данные являются противоречивыми.

Учитывая эффекты резистентности к инсулину, постоянный интерес в медицине вызывают методы лечения, способные улучшить это патологическое состояние и тем самым вызвать терапевтические/профилактические эффекты для ассоциированных с ним или возникающих вследствие него патологий.

### Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что страдающие ожирением субъекты с T2D-ассоциированной или не ассоциированной с T2D резистентностью к инсулину демонстрируют высокие циркулирующие (внеклеточные) уровни как Hsp70, так и GRP78 в ответ на жидкую диету с высоким содержанием жиров и сахарозы. Однако, при введении этой жидкой диеты через назоюнальную трубку ниже двенадцатиперстной кишки, эта реакция почти полностью исчезает, приводя к значительному улучшению чувствительности к инсулину и гликемического контроля. Затем авторы изучили действие Sleeveballoon - устройства от фирмы Keyron Ltd, которое позиционируется эндоскопически, уменьшает объем желудка и обходит транзит пищи в двенадцатиперстную кишку - у инсулинорезистентных крыс с T2D, и обнаружили, что белки теплового шока, в частности, Hsp70 и GRP78, секретируемые

двенадцатиперстной кишкой во время диеты с высоким содержанием жиров, ответственны за резистентность к инсулину и гипергликемию, и на крысах подтвердили, что ингибирование их активности устраняет резистентность к инсулину и улучшает гликемический контроль.

На основании проведенных экспериментов и тестов авторы настоящего изобретения обнаружили, что ингибирование активности белка Hsp70 и белка GRP78 позволяет лечить резистентность к инсулину и/или патологии, связанные с ней или возникающие вследствие нее.

Таким образом, объектом изобретения является ассоциация ингибиторов активности белка Hsp70 или активности белка, принадлежащего к семейству HSP70, и ингибиторов активности GRP78 для применения в лечении резистентности к инсулину и/или патологий, возникающих вследствие резистентности к инсулину или связанных с ней.

Более того, авторы настоящего изобретения дополнительно обнаружили, что белки Hsp70 и GRP38 можно применять в качестве биомаркеров для диагностики резистентности к инсулину; следовательно, объектом изобретения является способ диагностики резистентности к инсулину, в котором в образцах крови измеряют концентрацию двух белков.

Концентрация в крови Hsp70 и GRP38 выше 256 пг/мл указывает на резистентность к инсулину.

#### Определение терминов

Ингибирование может происходить на уровне белка, транскрипции или трансляции.

Под ассоциацией в настоящем описании подразумевается ассоциация активных ингредиентов, находящихся в форме физической смеси, состоящей из указанных активных ингредиентов, в единой единице дозирования, а также в виде единиц дозирования, физически разделенных по активному ингредиенту (подразумевается как ингибитор/ы Hsp70 или белка, принадлежащего к семейству HSP70, и ингибитор/ы GRP78), но предназначенных для одновременного или последовательного введения таким образом, что каждый активный ингредиент обеспечивает желаемый терапевтический эффект по существу одновременно с другим ингредиентом.

В соответствии с настоящим описанием под фрагментами антител подразумевают фрагменты антител, содержащие антигенсвязывающий сайт, связывающий представляющий интерес антиген (в данном случае HSP70-

специфические антигены или антигены, специфические в отношении белка, принадлежащего к семейству HSP70, как определено в настоящем документе, или GRP78-специфические антигены), такие как фрагменты Fab, Fv, dAb.

Термин антитела в настоящем описании включает моноклональные антитела, рекомбинантные антитела и слитые белки, в которых эффекторный белок связан с фрагментом антитела, распознающим HSP70-специфический антиген, или распознающим антиген, специфический в отношении одного из белков, принадлежащих к семейству HSP70, таких как, например, белки, указанные в таблице 0, или распознающим GRP78-специфический антиген.

#### Подробное описание фигур

Фигура 1: Кривые уровня глюкозы в плазме (верхняя панель) и инсулина в плазме (нижняя панель) после жидкой пищи у субъектов с NGT. Серые ромбы и серые сплошные линии обозначают данные после перорального приема. Черные квадраты и черные линии обозначают данные после введения пищи в тощую кишку.

Фигура 2: Кривые уровня глюкозы в плазме (верхняя панель) и инсулина в плазме (нижняя панель) после жидкой пищи у субъектов с T2D. Серые ромбы и серые сплошные линии обозначают данные после перорального введения. Черные квадраты и черные линии обозначают данные после введения пищи в тощую кишку.

Фигура 3: Кривые изменения во времени уровня Hsp70 в сыворотке после жидкой пищи у пациентов с NGT (верхняя панель) и с T2D (нижняя панель). Серые ромбы и серая сплошная линия обозначают пероральный прием жидкой пищи. Черные квадраты и черная сплошная линия обозначают жидкую пищу, вводимую непосредственно в тощую кишку.

Фигура 4: Кривые изменения во времени уровня GRP78 в сыворотке после жидкой пищи у пациентов с NGT (верхняя панель) и с T2D (нижняя панель). Серые ромбы и серая сплошная линия обозначают пероральный прием жидкой пищи. Черные квадраты и черная сплошная линия обозначают жидкую пищу, вводимую непосредственно в тощую кишку.

Фигура 5: Кривые изменения GLP1 во времени после жидкой пищи у пациентов с NGT (верхняя панель) и с T2D (нижняя панель). Серые ромбы и серая сплошная линия обозначают пероральный прием жидкой пищи. Черные квадраты и черная сплошная линия обозначают жидкую пищу, вводимую непосредственно в тощую кишку.

Фигура 6: Масса тела крысы в конце исследования (10 недель HFD до операции и +10 недель после операции).

Фигура 7: Уровни глюкозы в крови (панель А) и инсулина в сыворотке (панель В) после OGTT у ложнооперированных крыс, у крыс с имплантированным Sleeveballoon, у крыс с имплантированным Sleeveballoon и одновременно с помпой для непрерывной инфузии, осуществляющей введение Hsp70 + GRP78 - все крысы с HFD - и у крыс со стандартной диетой и непрерывной инфузией Hsp70 + GRP78.

На фигуре 8 показаны срезы печени, окрашенные гематоксилином/эозином. Стрелка указывает на липидную каплю.

Фигура 9: Akt, фосфорилированная по Ser473, измеренная с помощью мультиплексного анализа в образцах эпитрохлеарных мышц, полученных методом биопсии.

Фигура 10: Akt, фосфорилированная по Ser473, измеренная с помощью мультиплексного анализа в образцах печени, полученных методом биопсии.

Фигура 11: На фигуре 11 показаны уровни аланинтрансаминазы (ALT) в плазме, выраженные в международных единицах на миллилитр (МЕ/мл). У крыс, получавших антитела против Hsp70/GRP78, уровни ALT составили одну треть от концентраций ALT у крыс, которым инфузировали контрольный носитель ( $52,33 \pm 11,86$  против  $152,33 \pm 55,01$  МЕ/мл,  $P > 0,0001$ ).

Фигура 12: На фигуре 12 показано процентное содержание коллагена, окрашенного сириусом красным, которое составило  $9,25 \pm 1,54$  у крыс, которым вводили моноклональные антитела против Hsp70/GRP78, и  $21,58 \pm 3,03\%$  у крыс, которым вводили контрольный носитель ( $P < 0,0001$ ).

На фигурах 13 и 14 показаны кривые гликемии и инсулинемии после OGTT у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложно оперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-HSP70 антитело и HFD + Sleeveballoon + рекомбинантный белок HSP70 (rHSP70) по сравнению с введением обоих антител или рекомбинантных белков.

На фигуре 15 показано содержание гликогена, выделенное окрашиванием PAS в скелетных мышцах и печени крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложнооперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-HSP70 антитело и HFD + Sleeveballoon + HSP70 рекомбинантный белок (rHSP70).

На фигуре 16 показано содержание липидов (выделено окрашиванием ORO) в скелетных мышцах и печени крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров

(HFD) и ложно оперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-HSP70 антитело и Sleeveballoon + HSP70 рекомбинантный белок (rHSP70).

На фигуре 17 показано содержание гликогена, выделенное окрашиванием PAS в скелетных мышцах и печени крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложнооперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-GRP78 антитело и HFD + Sleeveballoon + GRP78 рекомбинантный белок (rGRP78).

На фигуре 18 показано содержание липидов (выделено окрашиванием ORO) в скелетных мышцах и печени крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложнооперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-GRP78 антитело и Sleeveballoon + GRP78 рекомбинантный белок (rGRP78).

На фигуре 19 показан эффект введения HSP70 или GRP78, в виде рекомбинантных белков или моноклональных антител, и показан значительный эффект на передачу сигналов инсулина.

#### Перечень последовательностей

SEQ ID NO 1: ugagaacuga auuccauggg uu; SEQ ID NO 2: uagcuuauca gacugauguu ga; SEQ ID NO 3: guuugucagu ucusaauuuu u; SEQ ID NO 4: aaauugagaa cugacaaacu u; SEQ ID NO 5: ccaucuuacg acuauiiucuu u; SEQ ID NO 6: agaaaauaguc guaagauggu u; SEQ ID NO 7: ggtggagatc atcgccaac; SEQ ID NO 8: gaugaauug gaaagcuaut t; SEQ ID NO 9: auagcuuucc aauiucauuct t; SEQ ID NO 10: aauuucugcc augguucisa cuaaaau; SEQ ID NO 11: aascuucasa gcuucugaua augaguc; SEQ ID NO 12: agacgcugga acuauiugcui

#### Подробное описание изобретения

Как сообщается в примерах по настоящему описанию, авторы изобретения обнаружили, что белки теплового шока Hsp70 и GRP78, секретлируемые двенадцатиперстной кишкой в ответ на диету с высоким содержанием жиров, отвечают за резистентность к инсулину и заболевания (патологии), связанные с ней или вызванные ею.

Данные, представленные в примерах и на фигурах, демонстрируют прямую корреляцию между секрецией указанных белков в двенадцатиперстной кишке и резистентностью к инсулину. Более того, данные, полученные на животных, также демонстрируют, что ингибирование активности указанных белков на тканях-мишенях (скелетные мышцы и печень) лечит и/или предупреждает резистентность к инсулину и предупреждает развитие заболеваний, вызванных ею, таких как диабет.

Следовательно, объектом изобретения является ассоциация ингибиторов активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и/или

ингибиторов активности GRP78 для применения в лечении резистентности к инсулину и/или патологий, возникающих вследствие резистентности к инсулину или связанных с ней, и как определено далее в настоящем документе.

Белки, принадлежащие к семейству HSP70 в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой белки, известные в литературе, в частности, белки, представленные ниже в таблице 0.

<b>ген</b>	<b>белок</b>	<b>синоним</b>
<u>HSPA1A</u>	Hsp70	HSP70-1, Hsp72
<u>HSPA1B</u>	Hsp70	HSP70-2
<u>HSPA1L</u>	Hsp70	
<u>HSPA2</u>	Hsp70-2	
HSPH2		HSPA4, HSP74
<u>HSPA5</u>	Hsp70-5	BiP/Grp78
<u>HSPA6</u>	Hsp70-6	HSP76
<u>HSPA7</u>	Hsp70-7	
<u>HSPA8</u>	Hsp70-8	Hsc70, HSP71
<u>HSPA9</u>	Hsp70-9	Grp75/mtHsp70
<u>HSPA12A</u>	Hsp70-12a	
<u>HSPA14</u>	Hsp70-14	

В соответствии с конкретным вариантом осуществления белки, принадлежащие к семейству HSP70, выбраны из HSP70, HSP71, HSP76, HSP74 и GRP75.

Ингибиторы в соответствии с изобретением могут действовать непосредственно на активность указанных белков на внеклеточном уровне или могут действовать на внутриклеточном уровне, например, путем ингибирования их синтеза или трансляции, предпочтительно в клетках кишечника.

В соответствии с настоящим изобретением ингибиторы представляют собой ингибиторы, специфические в отношении каждого из указанных белков, т.е. ингибиторы, специфические в отношении Hsp70 или для других белков, принадлежащих к семейству HSP70, как определено выше, и ингибиторы,



специфические в отношении GRP78, т.е. ингибиторы, действующие на активность вышеуказанных белков без взаимодействия с другими белками. Примеры ингибиторов в соответствии с настоящим изобретением представлены моноклональными антителами, специфическими в отношении Hsp70 или других белков, принадлежащих к семейству HSP70, как определено выше, или в отношении GRP78; их фрагментами, сохраняющими специфичность и способность ингибировать активность Hsp70 или активность других белков, принадлежащих к семейству HSP70, как определено выше, или GRP78; микроРНК, ингибирующей транскрипцию мРНК, кодирующей Hsp70 или другие белки, принадлежащие к семейству HSP70, как определено выше, или GRP78; или молекулами, ингибирующими их рецепторы или блокирующими пострецепторное действие.

Неограничивающий пример ингибиторов активности Hsp70 или активности других белков, принадлежащих к семейству HSP70, как определено выше, представлен моноклональными антителами или их фрагментами, как определено выше, специфическими в отношении белка Hsp70 или других белков, принадлежащих к семейству HSP70, как определено выше (под термином «специфический» подразумевается связывание исключительно белка Hsp70 или отдельного белка, принадлежащего к семейству HSP70, как определено выше, и ингибирование его активности), молекулами интерферирующих РНК, таких как малая интерферирующая РНК (siRNA), которые связывают исключительно мРНК, кодирующую Hsp70 или кодирующую белок, принадлежащий к семейству HSP70, как определено выше.

В соответствии с настоящим описанием считается возможным использовать для указанных терапевтических целей также ингибиторы толл-подобных рецепторов TLR4 и/или TLR9, такие как, например:

куркумин [(1E,6E)-1,7-бис-(4-гидрокси-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-дион], экстрагированный из *Curcuma longa*, сульфорафан (SFN) [1-изотиоцианат-4-(метилсульфинил)бутан] из *cruciferae*, иберин из *cruciferae*, ксантоумол (XN) представляет собой флавоноид халконового типа из *Humulus lupulus*, пентациклический тритерпеноид целастрол, выделенный из *Tripterygium wilfordii*, берберин, атрактиленолид I, жанкуевова кислота A, *Rhodobacter sphaeroides* липид A (RsDPLA), который представляет собой липид A 1,4'-дифосфорил пент-ацил, липид A 1,4'-дифосфорил пента-ацил из *Bartonella quintana* (BqLOS).

В соответствии с настоящим описанием считается возможным использовать для указанных терапевтических целей также синтетические ингибиторы толл-подобных рецепторов TLR4 и/или TLR9, такие как, например:

Эриторан, miR-146a или микроРНК-146a (SEQ ID NO 1), miR-21 или микроРНК-21 (SEQ ID NO 2), NAINP, HDL-подобные NP, Bare GNP, покрытые гликолипидом GNP, гибрид пептид-GNP.

В соответствии с настоящим изобретением моноклональные антитела могут быть выбраны из любого моноклонального антитела или его фрагмента, способного связывать HSP70 и ингибировать его активность, примером такого типа антитела может служить моноклональное антитело HSP70 (3A3) или (5A5), или (4G4), или (MB-H1), или C92F3A Invitrogen Thermo Fisher Sci, или другие моноклональные антитела против Hsp70, доступные на рынке.

Моноклональные антитела, специфически связывающие индивидуальные белки, принадлежащие к семейству HSP70, также доступны на рынке, такие как антитела против GRP75, моноклональные антитела, специфические в отношении HSP71, моноклональные антитела, специфические в отношении HSP76, и моноклональные антитела, специфические в отношении HSP74.

Молекулы для РНК-интерференции (RNAi) могут быть выбраны из любой siRNA, способной ингибировать активность белка HSP70 или белка, принадлежащего к семейству HSP70, как определено выше, при этом неограничивающим примером указанных siRNA служит одна или несколько из (siRNA; Genolution, Seoul, South Korea) HSP70-1 (#1), SEQ ID NO 3 (смысловая) и 5' SEQ ID NO 4 (антисмысловая), HSP70-1 (#2), SEQ ID NO 5 (смысловая) и SEQ ID NO 6 (антисмысловая) (Korea Human Gene Bank, Medical Genomics Research center, KRIBB, Korea).

SEQ ID NO 7 HSP70 siRNA длиной 19 пар оснований соответствует нуклеотидам от 563 до 581 HSP70 (номер доступа в GenBank M11717).

Специалист в данной области так или иначе будет знать, как сконструировать siRNA, способные ингибировать белок HSP70 или белки, принадлежащие к семейству HSP70, как определено в настоящем документе, с использованием соответствующих программ, доступных публично, нуклеотидные и аминокислотные последовательности указанных белков, а также последовательность мРНК указанных белков, которая известна. Кроме того, может быть использован разрезающий ДНК белок Cas9, переносимый в гастрорезистентных капсулах или в глутамате хитозана, который

разрезает ДНК в требуемой зоне, с использованием подходящей направляющей РНК, тем самым ингибируя синтез белка *in situ*.

Неограничивающим примером ингибиторов активности GRP78, известных и подходящих для осуществления настоящего изобретения, являются моноклональные антитела, специфические к белку GRP78 (под термином «специфические» подразумевается, что они связывают исключительно белок GRP78), молекулы интерферирующих РНК, такие как siRNA, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую GRP78.

Моноклональные антитела могут быть выбраны из любого моноклонального антитела или его фрагмента, способного связывать белок GRP78 и ингибировать его активность, при этом примером указанного типа антитела может служить GRP78 Monoclonal Antibody (C38), eBioscience™, направленное к С-концевому домену, или GRP78 Monoclonal Antibody, направленное к N-концевому домену.

Молекулы для РНК-интерференции (RNAi) могут быть выбраны из любой siRNA, способной ингибировать активность белка GRP78, при этом неограничивающим примером такой siRNA служит siRNA GRP78 (смысловая SEQ ID NO 8, антисмысловая SEQ ID NO 9) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) (мРНК, номер доступа в GenBank NM\_005347) или даже siGRP78-1, смысловая: SEQ ID NO 10 и siGRP78-2, смысловая SEQ ID NO 10).

Также, для ингибирования активности GRP78, можно использовать переносимый в гастрорезистентных капсулах или в глутамате хитозана разрезающий ДНК белок Cas9, который разрезает ДНК в требуемой зоне, используя подходящую направляющую РНК, тем самым ингибируя синтез белка *in situ*.

Как указано выше, ингибирование может быть осуществлено путем ингибирования активности одного или нескольких из вышеупомянутых белков в циркулирующей форме, следовательно, внеклеточно, следовательно, антителами или их активными фрагментами, и/или путем ингибирования, на кишечном уровне, внутриклеточной экспрессии одного или обоих вышеупомянутых белков, следовательно, молекулами интерферирующих РНК, как определено выше.

В одном конкретном варианте осуществления ингибируется активность одного или обоих вышеупомянутых белков во внеклеточной форме, а также ингибируется активность одного или обоих вышеупомянутых белков на внутриклеточном уровне в клетках кишечника.

Ингибирование на внутриклеточном уровне, локализованное в клетках кишечника, может быть достигнуто путем составления молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую по меньшей мере один белок, принадлежащий к семейству HSP70, как определено в настоящем документе, и/или молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую GRP78, в гастрорезистентные составы, которые, следовательно, обеспечивают перенос таких ингибиторов исключительно в кишечник, что в результате приводит к внутриклеточному ингибированию, ограниченному клетками кишечника.

По существу, в соответствии с настоящим изобретением, интерферирующая РНК, такая как, например, siRNA, будет использована для подавления синтеза по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству HSP70, как определено в настоящем документе, и/или GRP78 исключительно в слизистой оболочке кишечника, с помощью препаратов, действующих только на этом уровне, пероральных введений, таких как NPL, MPP или гастрорезистентные капсулы, содержащие соответствующие интерферирующие РНК, обеспечивая перенос указанных РНК в клетки двенадцатиперстной кишки и тощей кишки. Фактически, диета с высоким содержанием жиров и простых сахаров стимулирует синтез и секрецию этих белков теплового шока, которые затем, вступая в контакт с мембранными рецепторами скелетных мышц и печени, определяют резистентность к инсулину и эктопическое накопление жира, помимо снижения содержания гликогена. Резистентность к инсулину определяет последующую гиперпродукцию инсулина эндокринной частью поджелудочной железы.

Моноклональные антитела или их фрагменты, как определено в настоящем документе, вместо этого направлены против по меньшей мере одного белка семейства HSP70, как определено в настоящем документе, и/или циркулирующего GRP78, т.е. присутствующего в крови, чтобы блокировать их эффект, то есть индукцию резистентности к инсулину. Составы, обеспечивающие локализованное в кишечнике внутриклеточное ингибирование путем переноса молекул интерферирующих РНК в клетки кишечника, известны в литературе и будут описаны ниже.

Любую комбинацию одного или нескольких ингибиторов активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и/или одного или нескольких ингибиторов активности GRP78, перечисленных выше, следует понимать как охватываемую объемом настоящего изобретения.

В одном предпочтительном варианте осуществления используют ассоциацию между одним или несколькими ингибиторами активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, выбранными из перечисленных выше, и одним или несколькими ингибиторами активности GRP78, выбранными из перечисленных выше.

Любая комбинация между двумя приведенными выше перечнями является объектом изобретения.

В одном варианте осуществления ассоциация по изобретению представлена моноклональными антителами, соответственно специфическими против по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству HSP70 и GRP78, или подавляющими РНК, соответственно специфическими в отношении Hsp70 и GRP78, например, выбранными из описанных выше или их комбинации. Альтернативно, может быть осуществлена ассоциация моноклональных антител, специфических против по меньшей мере одного белка из семейства Hsp70, и подавляющих РНК, специфических в отношении по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, принадлежащий к семейству HSP70, например, выбранных из описанных выше, или ассоциация моноклональных антител, специфических против GRP78, и подавляющих РНК, специфических в отношении РНК, кодирующей GRP78, например, выбранных из описанных выше. Однако специалист в данной области будет знать, как выбрать или получить другие моноклональные антитела или их фрагменты, подходящие для осуществления изобретения, или другие siRNA, подходящие для осуществления изобретения, имея в виду, что указанные антитела или их фрагменты, или указанная siRNA должны действовать таким образом, чтобы ингибировать активность соответствующих белков, для которых они являются специфическими.

Объектом изобретения является также терапевтический способ лечения резистентности к инсулину, а также лечения и/или предупреждения заболеваний (патологий), возникающих вследствие нее или связанных с ней, в котором ингибиторы или их ассоциацию в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления вводят субъекту, страдающему резистентностью к инсулину или заболеваниями, возникающими вследствие нее или связанными с ней.

В любом месте настоящего описания и формуле изобретения термин белок, принадлежащий к семейству HSP70, может быть заменен любым из белков, указанных в таблице 0.

В одном конкретном варианте осуществления термин белок, принадлежащий к семейству HSP70, может быть заменен в любом месте в настоящем описании и в формуле изобретения термином HSP70, HSP71, HSP76, HSP74 и GRP75.

Одним из примеров заболеваний (патологий), возникающих вследствие резистентности к инсулину или связанных с ней, в соответствии с настоящим изобретением, служит диабет, гипертензия, дислипидемия, сердечно-сосудистое заболевание и другие отклонения. Эти отклонения представляют синдром инсулинорезистентности. Поскольку резистентность обычно развивается задолго до появления этих заболеваний, выявление и лечение инсулинорезистентных пациентов имеет потенциально положительное значение. Резистентность к инсулину может быть заподозрена, например, у пациентов с диабетом в анамнезе у родственников первой степени родства; пациентов с гестационным диабетом, синдромом поликистозных яичников или пониженной толерантностью к глюкозе в личном анамнезе; и у пациентов с ожирением, особенно с абдоминальным ожирением.

Ожирение, сахарный диабет 2 типа (ранее известный как инсулиннезависимый диабет), гипертензия, нарушения липидного обмена и сердечные заболевания распространены в большинстве западных обществ и в совокупности являются причиной огромных страданий. Многие люди имеют более одного - а иногда и все - из этих состояний, что приводит к гипотезе о том, что совместное существование этих заболеваний не случайно, и что имеющее общую основу отклонение позволяет им развиваться. В 1988 году было высказано предположение о том, что этот дефект связан с инсулином, и впервые был описан синдром инсулинорезистентности.

Инсулин стимулирует поглощение глюкозы в тканях, и его способность к этому значительно различается у разных людей. При инсулинорезистентности ткани проявляют пониженную способность реагировать на действие инсулина. Чтобы компенсировать резистентность, поджелудочная железа секретирует больше инсулина. Следовательно, резистентные к инсулину индивидуумы имеют высокие уровни инсулина в плазме. Среди нарушений, возникающих вместе с резистентностью к инсулину или развивающихся вследствие нее, присутствует ожирение, гипертония, дислипидемия и диабет 2 типа, которые фактически связаны с резистентностью к инсулину и компенсаторной гиперинсулинемией. Из литературы известно, что патологиями, возникающими в результате/стимулированными или связанными с резистентностью к инсулину, являются, например, гипергликемия, диабет 2 типа, NASH (неалкогольный стеатогепатит), NAFLD (неалкогольная жировая болезнь

печени), метаболический синдром, атеросклероз, синдром поликистозных яичников, дислипидемия, ожирение, сердечно-сосудистое заболевание, гипертензия.

В одном варианте осуществления указанные заболевания, возникающие вследствие резистентности к инсулину или связанные с ней, выбраны из гипергликемии, диабета 2 типа, метаболического синдрома, атеросклероза, синдрома поликистозных яичников, дислипидемии, ожирения, сердечно-сосудистого заболевания, гипертензии, NASH, NAFLD и фиброза печени. Данные, полученные на крысах, представленные в экспериментальном разделе, демонстрируют, например, предупреждение диабета 2 типа с помощью ингибиторов или их ассоциации в соответствии с настоящим описанием.

Объектом изобретения является также композиция, содержащая ингибиторы белковой активности, активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и/или ингибиторы активности белка GRP78 в соответствии с любым из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании, и одно или несколько вспомогательных веществ или носителей, фармакологически приемлемых для применения в лечении резистентности к инсулину и/или в лечении или предупреждении патологий, возникающих вследствие резистентности к инсулину или связанных с ней.

Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления композиция по изобретению содержит один или несколько ингибиторов активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, который может быть выбран из одного или нескольких ингибиторов, перечисленных выше.

В соответствии с другим вариантом осуществления композиция по изобретению может, таким образом, содержать один или несколько ингибиторов активности GRP78, которые могут быть выбраны из одного или нескольких ингибиторов GRP78, перечисленных выше.

Композиция по изобретению может содержать любую комбинацию одного или нескольких ингибиторов активности Hsp70, и одного или нескольких ингибиторов активности GRP78, перечисленных выше, которые следует понимать как охваченные объемом настоящего изобретения.

Все варианты осуществления, в которых конкретные комбинации ингибиторов для каждого из двух белков указаны для ассоциации, следует понимать как варианты осуществления, которые также могут быть реализованы при изготовлении композиции по изобретению.

Таким образом, объектом изобретения является композиция, содержащая ингибиторы активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и/или ингибиторы активности белка GRP78, и одно или несколько вспомогательных веществ или носителей, фармакологически приемлемых для применения в лечении резистентности к инсулину и/или патологий, возникающих вследствие резистентности к инсулину или связанных с ней, где указанные ингибиторы по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству HSP70, выбраны из одного или нескольких моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка Hsp70, или в отношении белка, принадлежащего к семейству HPS70, как определено в настоящем документе, и/или молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую Hsp70 или белок, принадлежащий к семейству HPS70, и указанные ингибиторы активности GRP78 выбраны из одного или нескольких моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка GRP78, и/или молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую GRP78.

В одном варианте осуществления композиция может, например, содержать одно или несколько моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка Hsp70, или в отношении белка, принадлежащего к семейству HSP70, и/или одно или несколько моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка GRP78.

В случае, если композиция содержит одно или несколько моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка Hsp70 или в отношении белка, принадлежащего к семейству HSP70, и моноклональных антител или их фрагментов, специфических к белку GRP78, указанные антитела или их фрагменты могут быть включены в единый состав или могут находиться в отдельных составах, подлежащих одновременному или последовательному введению.

В еще одном варианте осуществления композиция может содержать молекулы интерферирующей РНК, специфические в отношении мРНК, кодирующей Hsp70 или белок, принадлежащий к семейству HSP70, и/или специфические в отношении мРНК, кодирующей GRP78.

Указанные молекулы интерферирующих РНК могут представлять собой siRNA, например, siRNA, определенные выше, например, siRNA, выбранные из одной или нескольких последовательностей SEQ ID 1-11.



В случае, если композиция содержит одну или несколько молекул интерферирующих РНК, как определено выше, они могут содержаться в едином составе или могут находиться в отдельных составах, подлежащих одновременному или последовательному введению.

Поскольку в случае молекул интерферирующих РНК (следовательно, вызывающих ингибирование на внутриклеточном уровне) желательное ингибирование кишечных клеток, указанные молекулы предпочтительно будут составлены в форме для перорального применения, гастрорезистентной, такой как капсулы, гель, мягкие таблетки или другие подходящие формы для переноса и высвобождения лекарственных средств на кишечном уровне.

Конкретный вариант осуществления настоящего изобретения представлен фармацевтической композицией в форме ассоциации для одновременного или последовательного введения, в которой различные классы активных ингредиентов, то есть антитела и молекулы интерферирующих РНК, соответственно обеспечены в составах для подкожного введения и в гастрорезистентных составах для перорального введения.

Что касается изготовления гастрорезистентных составов, специалист в данной области знает, что существует более 10 фармацевтических препаратов, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), в которых в качестве систем доставки лекарственных средств используются липидные наночастицы (LNP).

Для осуществления изобретения могут быть использованы системы LNP, нагруженные одной или несколькими siRNA, как описано в настоящем документе, содержащие ионизируемый липид, необязательно включенные в гастрорезистентные составы.

Специалист в данной области может выбрать любую из систем, известных в литературе, для перорального введения молекул интерферирующих РНК, предпочтительно выбирая системы, уже одобренные для переноса указанных молекул на кишечном уровне.

Одним из примеров ионизируемого липида является 1,2-дидолеил-N,N-диметил-3-аминопропан (DLinDMA).

Альтернативно, могут быть созданы системы LNP, нагруженные одной или несколькими siRNA, как описано в настоящем документе, содержащие ионизируемые

катионные липиды, которые обладают функциональной аминогруппой и константой кислотной диссоциации (pKa) около 6,5 (3).

Примером указанных липидов является ионизируемая липидная форма DLin-KC2-DMA, подробно описанная в материалах и способах, и в статье Semple, S. C. et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. Nat. Biotechnol. 2010; 28: 172–176.

В одном варианте осуществления LNP, нагруженные siRNA, описанными в настоящем документе, можно вводить непосредственно перорально, без заключения в гастрорезистентную капсулу, натошак, в результате чего они вступают в контакт с очень небольшими концентрациями пепсина и желчных кислот и не сталкиваются с конформационными изменениями, что делает возможным интериоризацию siRNA-содержащих LNP в слизистую оболочку кишечника.

В качестве альтернативы можно использовать проникающие в слизь наночастицы, известные специалистам в данной области как MPP (частицы, проникающие в слизь), которые диффундируют через слизь со скоростью, сравнимой с диффузией в воде. Известно, что MPP имеют диаметр около 100 нм, имеют нейтральный заряд и высокие уровни низкомолекулярного полиэтиленгликоля (PEG) на своей поверхности.

Известны MPP, которые характеризуются покрытием из PEG.

Альтернативно, интерферирующие РНК можно вводить в гастрорезистентных капсулах, открывающихся в двенадцатиперстной кишке или тощей кишке, изготовленных любым методом, известным в данной области.

Доза siRNA (HSP70, или по меньшей мере белка, принадлежащего к семейству HSP70 и/или GRP78, как описано в данном документе), которую можно вводить человеку, может варьироваться от 0,01 до 3 мг/кг массы тела.

Составы siRNA, которые можно применять у человека, предназначены:

для подавления кишечного синтеза HSP70 или по меньшей мере белка, принадлежащего семейству HSP70, можно использовать MISSION HSPA1A siRNA (SASI\_Hs01\_00051449; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) при конечной концентрации 50 нМ в катионной липосоме (такой как, например, реагент Lipofectamine RNAiMAX Reagent; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) или одну из siRNA, описанных в настоящем документе и представленных в разделе «Перечень последовательностей»;

для подавления синтеза GRP78 в кишечнике, можно использовать siRNA, имеющие последовательность SEQ ID NO 12 (Genechem Corporation (Shanghai, China)), переносимые в липофектamine 2000 (Invitrogen).

Композицию по изобретению можно применять для лечения резистентности к инсулину и/или для лечения или предупреждения патологий, связанных с ней или возникающих вследствие нее. Указанные патологии представляют собой, например, гипергликемию, диабет 2 типа, метаболический синдром, атеросклероз, синдром поликистозных яичников, дислипидемию, ожирение, сердечно-сосудистое заболевание, гипертензию, NASH, NAFLD и фиброз печени. Следовательно, объектом изобретения также является способ лечения резистентности к инсулину и/или лечения или предупреждения патологий, связанных с ней или возникающих вследствие нее, представленных, например, перечисленными выше патологиями, включающий введение композиции по изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

Композиция по изобретению может быть изготовлена в виде состава, подходящего для перорального, системного, интраназального или внутривенного введения.

Предпочтительно, в случае введения антител, предпочтительным будет состав для системного введения, в частности, подкожного введения.

В случае введения молекул интерферирующих РНК предпочтительным будет гастрорезистентный состав для перорального введения, такой как, например, NLP или MPP, как описано выше.

Как в ассоциации, так и в композиции в соответствии с изобретением, ингибиторы, когда они находятся в форме моноклональных антител, могут быть обеспечены для каждого целевого белка в количестве 50-250 нг/кг, например, путем подкожной инъекции. Введение каждой дозы антитела может быть одновременным или последовательным и может повторяться один раз в неделю или каждые 2 недели. В одном варианте осуществления каждое антитело можно вводить, в комбинации или последовательно, в составе, обеспечивающем их замедленное высвобождение, например, путем связывания антитела с альбумином и/или жирными кислотами, и/или дикарбоновыми кислотами.

Кроме того, объектом изобретения является способ диагностики резистентности к инсулину у человека, в котором:

- a. измеряют концентрацию белков Hsp70 и GRP78 в образце крови,
- b. концентрация в крови указанных белков выше 256 пг/мл указывает на резистентность к инсулину.

Образец крови может представлять собой образец цельной крови, плазмы или сыворотки.

В соответствии с изобретением также можно использовать способ диагностики по изобретению в рамках терапевтического лечения, как описано в настоящем документе, в котором сначала подтверждают концентрацию белков Hsp70 и GRP78, а затем переходят к введению ингибиторов, как определено в настоящем документе и в соответствии с описанием.

В любом месте описания и формулы изобретения термины HSP70, семейство HSP70 и GRP78 могут быть заменены соответственно терминами HSP70 человека, семейство HSP70 человека, GRP78 человека.

В следующих примерах представлены экспериментальные данные, полученные авторами изобретения, демонстрирующие прямую корреляцию между экспрессией Hsp70 и GRP78 в двенадцатиперстной кишке и патологией резистентности к инсулину.

Все эксперименты с участием людей проводили с одобрения этического комитета Ethics Committee of the Università Cattolica del Sacro Cuore of Rome, Italy, и зарегистрированные субъекты подписали информированное согласие на исследование. Все исследования на животных были одобрены этическим комитетом Ethics Committee for Animal Experimentation of the Università Cattolica del Sacro Cuore of Rome, Italy.

## ПРИМЕРЫ

### **1. Исследования на людях**

#### *Субъекты*

Шесть инсулинорезистентных субъектов, из которых 3 с T2D и 3 без него, были включены в исследование после того, как оно было одобрено этическим комитетом Ethics Committee of the Università Cattolica of Rome, Italy. Все субъекты подписали информированное согласие на исследование в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации в отношении экспериментов на людях.

Критерии включения представляли собой следующие: мужчины и женщины в возрасте 30-60 лет, индекс массы тела (BMI) 30-40 кг/м<sup>2</sup>, гликированный гемоглобин (HbA<sub>1c</sub>) от 6,5% до 8,5% (для пациентов с диабетом).

Субъектов с нормальной толерантностью к глюкозе (NGT) набирали на основании отсутствия диабета после кривой пероральной нагрузки глюкозой. Все пациенты с диабетом были вновь диагностированы и имели инсулинорезистентность (НОМА-IR > 2,60).

Критериями исключения являлось наличие в активном состоянии основных заболеваний эндокринологического, почечного, сердечного, респираторного, печеночного или желудочно-кишечного типа.

Пациенты произвольным образом получали жидкую пищу, вводимую перорально или в тощую кишку. За один сеанс испытуемые получали 200 мл Calogen Extra (Nutricia) (400 ккал/100 мл), содержащий 4 г/100 мл белков, 4,5 г/100 мл углеводов и 40,3 г/100 мл жиров - с добавлением 40 г сахарозы (157,6 ккал), с получением следующего состава пищевого продукта: **белки 8 г, простые углеводы 49 г и жиры 80,6 г.**

На другом сеансе кишечник инканюлировали с помощью зонда 10 French длиной 240 см (Cook Medical, Bloomington, IN), трубку соединяли с баллоном, закрывающим просвет кишечника перед местом инфузии. Такую же жидкую пищу вводили в тощую кишку менее чем за 10 минут.

Образцы крови собирали в момент времени -30 мин и через 0, 15, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 240, 300 и 360 минут для определения уровня глюкозы, инсулина и глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) во время каждого исследования (на несколько точек меньше для GLP1).

#### *Методы анализа*

Гликемию измеряли с помощью анализатора глюкозы Analox GM9 (Beckman Instruments, Fullerton, CA) сразу же после сбора.

Инсулин в плазме крови измеряли с помощью хемилюминесцентного иммуноанализа ARCHITECT® (Abbott Laboratories).

GLP-1 (7-36)амид/(7-37) измеряли с помощью набора для иммуноферментного анализа GLP-1 (активного) (Linco). Эта дозировка основана на моноклональном антителе, покрывающем лунки и связывающем NH<sub>2</sub>-концевую область активного GLP1. Концентрация GLP1 пропорциональна флуоресценции, генерируемой умбеллифероном, которая возникает в результате реакции между щелочной фосфатазой, связанной с моноклональными антителами против GLP1, и метил-умбеллиферил-фосфатом. Предел обнаружения метода составляет 2 пмоль/л; коэффициент вариации внутри одной процедуры (VC) составляет 8%, как при низких, так и при высоких концентрациях (диапазон 4-76 пмоль/л), и между различными процедурами VC составляет 12% для 4-8 пмоль/л и 7% для 28-76 пмоль/л. Перекрестная реактивность составляет 100% для GLP-1 (7-36)амида и GLP-1 (7-37), но не поддается измерению для GLP-1 (9-36) амида, GLP-2 и глюкагона.

#### *Статистические данные*

Все данные выражены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD), если не указано иное. Тест Вилкоксона использовали для сравнения данных внутри одной группы.  $P < 0,05$  считается значимым.

Чувствительность к инсулину во время приема пищи измеряли с помощью модели Oral Glucose Insulin Sensitivity (OGIS) (13). OGIS обеспечивает показатель чувствительности к инсулину, аналогичный тому, который определяется в «клэмп»-тесте.

## **2. Исследования на животных**

### **Животные**

Крыс содержали в Stabularium of the Università Cattolica of Rome (Italy) в стандартных и контролируемых условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры на животных были одобрены этическим комитетом Ethics Committee for Animal Experimentation of the Università Cattolica del Sacro Cuore of Rome, Italy.

Исследование состояло из 5 групп животных. Крысы Wistar (250–300 г) получали *ad libitum* диету с высоким содержанием жиров (HFD), содержащую очищенный трипальмитин (Rieper AG, Bolzano, Italy), которая обеспечивала 71% энергии за счет насыщенных жиров, хотя кукурузное масло (1,9/100 г диеты) также присутствовало для предотвращения дефицита незаменимых жирных кислот, 20% углеводов, включая кукурузный крахмал и сахарозу (2:1 масс./масс.) и 10% белков, в течение 10 недель в контролируемых условиях (12:12 часовые циклы свет/темнота, влажность 50-60%, 25 °C со свободным доступом к пище и воде, отдельно, если это предписано) перед установкой Sleeveballoon или ложной операцией. Крысы получали HFD в течение 10 недель после операции, и хирурги всегда были всегда одними и теми же.

Группа А состояла из крыс, подвергнутых ложной операции ( $n = 7$ ). Группа В состояла из крыс, получавших HFD, которым имплантировали Sleeveballoon ( $n = 7$ ). Группа С состояла из 7 крыс, получавших стандартную диету, которым подкожно имплантировали перезаряжаемую инфузионную помпу (осмотический насос Alzet, Cupertino, CA), при этом указанная помпа содержала как Hsp70, так и GRP78, со скоростью инфузии 500 пг/час для каждого белка теплового шока (всего 1000 пг/мл), которые вводили в течение 10 недель. Группа D состояла из 7 крыс, получавших HFD, у которых инфузионная помпа была установлена под кожей в области шеи, непрерывно вводя моноклональные антитела (HSP70 Monoclonal Antibody (5A5), Thermo Fisher Scientific; GRP 78 Antibody (76-E6), Santa Cruz Biotechnology) против Hsp70 и GRP78 с

общей скоростью инфузии 1000 пг/час (500 пг для Hsp70 и 500 пг для GRP78) в течение 10 недель. Группа E, в которой 7 крысам имплантировали Sleeveballoon и одновременно устанавливали инфузионную помпу под кожей в области шеи и непрерывно вводили Hsp70 и GRP78 со скоростью инфузии 500 пмоль/час каждого, всего 1000 пмоль/час в течение 10 недель.

### **Операция**

Крыс анестезировали кетаминном (75 мг/кг внутримышечно) и ксилазином (10 мг/кг внутримышечно). Перед операцией подкожно вводили 10 мл 0,9% NaCl в стерильном растворе.

На брюшной стенке производили лапаротомный разрез длиной 3 см, желудок изолировали за пределы брюшной полости и укладывали на марли, пропитанные физиологическим раствором. Как у ложноперитонизированных крыс, так и в группе Sleeveballoon небольшой разрез делали в стенке дна желудка для введения устройства (Sleeveballoon, изготовленный из силикона с центральным каналом и переходящим в 10 см катетер 10-12 French catheter) или для ложной операции.

Крыс, помещенных в отдельные клетки, еженедельно взвешивали и исследовали через 10 недель после операции.

Затем разрез на стенке желудка зашивали, и желудок помещали в брюшную полость. Наконечник, стенку живота послойно закрывали. После операции крысы получали в течение 3 дней 10 мл/день физиологического раствора под кожу и 0,3 мл Виргенех. Перед операцией крыс не кормили в течение 24 часов, и после операции в течение 3 дней они имели доступ к жидкой диете Osmolite OneCal до перехода на кормление в обычном режиме.

### ***Послеоперационные исследования***

Основные данные получали через 6-8 часов голодания. Пероральные тесты на толерантность к глюкозе (OGTT; 1 г/кг массы тела) проводили путем введения глюкозы через желудочный зонд. Образцы крови брали через 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 и 180 минут после болюса глюкозы для измерения гликемии и инсулинемии. В конце OGTT кровь собирали пункцией сердца и помещали в пробирки, содержащие EDTA, аprotинин и ингибитор дипептидилпептидазы 4 (DPP-4), и анализировали глюкагоноподобный пептид 1 (GLP1). После центрифугирования плазму разделяли на аликвоты и субпробы, и хранили при -20 °C до анализа.

### ***Гистология***

Крыс умерщвляли и у каждой крысы брали свежие срезы печени, фиксировали в (10%) формалиновом буфере и дегидратировали в градиентах этанола (70%, 80%, 90%, 95% и 100%). После обезвоживания образцы помещали в ксилол. Наконец, образцы заливали парафином и разрезали на микротоме (3-4 мкм). Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Срезы фотографировали с помощью оптического микроскопа (ZEISS Primo Star HAL/LED).

#### *Анализ тканевых фосфопротеинов*

Биопсии эпитрохлеарных мышц и печени измельчали и помещали в сухой лед с реагентом Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) с добавлением коктейля протеаз и ингибитора фосфатазы (Thermo Scientific). Затем очень маленькие кусочки ткани гомогенизировали с помощью TissueRuptor (Qiagen) и перемешивали на вортексе в течение 10 минут при 4 °С. Затем образцы центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин, супернатант собирали и хранили при -80 °С до анализа. Общее содержание белка измеряли с помощью анализа белка BCA (Thermo Scientific).

Затем использовали набор для дозирования общего белка и фосфопротеина с магнитными шариками для Akt<sup>Ser473</sup>, GSK3 $\alpha$ <sup>Ser21</sup>, GSK3 $\beta$ <sup>Ser9</sup>, IGF1R<sup>Tyr1131</sup>, IRS1<sup>Ser636/639</sup>, ERK1/2<sup>Thy202/204, Thy185/187</sup>.

Среднюю интенсивность флуоресценции измеряли для каждого анализата с помощью системы Bio-Plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Среднюю интенсивность флуоресценции конкретного фосфорилированного белка нормализовали по количеству общего белка с получением соответствующих единиц.

Для простоты авторы изобретения сообщают только данные Akt.

#### *Способы анализа*

Уровни глюкозы в крови анализировали с помощью глюкометра Accu-Check Mobile (Roche Diabetes Care).

Сывороточный инсулин измеряли с помощью набора для ELISA, сверхчувствительного к инсулину крыс (BioVendor, Kassel, Germany), с чувствительностью 0,025 нг/мл и 10% точностью в пределах дозировки и среди различных дозровок. GLP-1<sub>7-36</sub> в плазме измеряли с помощью специфического для крыс ELISA для грызунов (Millipore, St. Charles, MO). Чувствительность к GLP-1<sub>7-36</sub> составляла 5,2 пг/мл, вариабельность <11% для одной и той же дозировки, вариабельность <19% для разных дозровок и точность 83%.

#### *Статистический анализ*



Индекс инсулинорезистентности НОМА (НОМА-IR) (13) вычисляли как: гликемия натощак (мг/дл)  $\times$  инсулин плазмы (мкЕД/мл)/405. Фактор 405 учитывает единицы измерения.

Площадь под кривой (AUC) рассчитывали методом трапеций. Чувствительность к инсулину после OGTT как отношение AUC глюкозы/AUC инсулина. Различия между группами рассчитывали с помощью *U*-критерия Манна-Уитни после проверки отсутствия нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Различия считались значимыми при  $P < 0,05$ . Корреляция Спирмена использовалась для проверки корреляций между переменными.

На фигуре 7 четко показано, что введение HSP70 и GRP78 вызывает резистентность к инсулину и гипергликемию, тогда как введение соответствующих моноклональных антител вызывает значительное улучшение чувствительности к инсулину и значительное снижение гликемических показателей.

#### ***Оценка чувствительности к инсулину и белков Hsp70 и GRP78 в образцах крови***

HSP70 и GRP78 валидизировали в качестве биомаркеров в другой когорте из 23 субъектов (12 женщин и 11 мужчин) с BMI  $35,75 \pm 7,41$  кг/м<sup>2</sup> (от 24,62 до 46,51) и средним возрастом  $44,09 \pm 13,23$  года. Чувствительность к инсулину оценивали с помощью модели Oral Glucose Insulin Sensitivity (OGIS) (Mari, G. Pacini, E. Murphy, B. Ludvik and J.J. Nolan. A Model-Based Method for Assessing Insulin Sensitivity from the Oral Glucose Tolerance Test. Diabetes Care 24:539-548, 2001). Среднее значение OGIS составило  $337,17 \pm 66,11$  мл/мин/м<sup>2</sup>, и средний уровень HSP70 и GRP78 составил  $285,70 \pm 141,47$  пг/мл.

Площадь под ROC-кривой (AUC) (Receiver Operating Characteristics, ROC) составила  $0,95 \pm 0,04$   $P < 0,0001$ . Оптимальное пороговое значение составило 256 пг/мл, выше которого субъекты были резистентными к инсулину, и оптимальный критерий составил 0,83 согласно методу Юдена.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### ***Исследование на людях***

Субъекты с NGT или T2D были разделены на пары по полу (2 мужчин и 1 женщина в группе субъектов с NGT, и 2 мужчин и 1 женщина в группе субъектов с диабетом), по возрасту ( $48,67 \pm 4,72$  года в группе с NGT и  $50,67 \pm 2,08$  года в группе субъектов с диабетом) и по BMI ( $43,60 \pm 0,93$  кг/м<sup>2</sup> в группе субъектов с NGT и  $42,41 \pm 0,94$  кг/м<sup>2</sup> в группе субъектов с диабетом). У субъектов с T2D среднее значение

HbA<sub>1c</sub> составляло 7,75%, это означает, что субъекты находились в состоянии умеренной диабетической декомпенсации.

AUC глюкозы и инсулина были значительно выше, когда жидкую пищу давали перорально, а не вводили непосредственно в тощую кишку, минуя двенадцатиперстную кишку, и это как у пациентов с NGT (фигура 1), так и у пациентов с T2D (фигура 2).

Отношение AUC глюкозы/AUC инсулина было значительно выше, когда пищу вводили непосредственно в тощую кишку; это означает, что количество глюкозы, выведенной из кровотока на единицу инсулина, было выше. Чувствительность к инсулину, измеренная с помощью OGIS, также была значительно выше, когда пища обходила двенадцатиперстную кишку (таблица 1).

	Среднее± SD	<i>P</i> (знаковый ранговый критерий Уилкоксона)
AUC глюкозы при пероральном введении	56568,33±	0,028
AUC глюкозы натошак	15949,22 48822,92±	
AUC инсулина при пероральном введении	23339,77±	0,028
AUC натошак	3928,66 12641,04 2367,88	
отношение AUC глюкозы/инсулина при пероральном введении	2,41±	0,028
отношение AUC глюкозы/инсулина натошак	0,45 3,90± 0,67	
OGIS при пероральном введении	296,38±	0,028
OGIS натошак	54,20 351,43± 74,01	
AUC HSP70 при пероральном введении	164081,67	0,028
AUC HSP70 натошак	35322,63 77669,17± 20802,20	
AUC GRP78 при пероральном введении	281156,67±	0,028
AUC GRP78 натошак	65622,55 93714,17± 20141,69	
AUC GLP1 при пероральном введении	1057,03±	0,345
AUC GLP1 натошак	180,73 1080,20± 158,50	

Таблица 1: Площадь под кривой (AUC) уровней глюкозы и инсулина; отношение AUC глюкозы/AUC инсулина; чувствительность к инсулину, измеренная с

помощью OGIS; AUC Hsp70, AUC GRP78 и AUC уровней GLP1 после жидкой пищи. Все измерения относятся к двум режимам введения (пероральному и тощей кишке).

Кривая циркулирующих уровней Hsp70 после перорального введения или введения в тощую кишку жидкой пищи у субъектов с NGT или T2D представлена на фигуре 3, при этом кривая циркулирующих уровней GRP78 представлена на фигуре 4.

Кривая изменения GLP1 во времени как у субъектов с NGT, так и у субъектов с T2D представлена на фигуре 5 и показывает, что пик ожидается, когда пищу вводят в тощую кишку, но без значительного увеличения AUC (таблица 1).

Множественная регрессия с OGIS в качестве зависимой переменной, и AUC Hsp70, AUC GRP78 и AUC GLP1 в качестве независимых переменных продемонстрировала, что величина  $R^2$  модели составила 0,772 при  $P < 0,0001$ ; частичная корреляция с AUC GRP78 составила -0,879 ( $P < 0,0001$ ), частичная корреляция с AUC Hsp70 составила -0,235 ( $P = 0,043$ ), при этом частичная корреляция с AUC GLP1 составила 0,098,  $P = 0,487$ . Таким образом, AUC GRP78 была переменной, объясняющей большую часть вариаций чувствительности к инсулину OGIS.

Концентрации Hsp70 и GRP78 в сыворотке крови, как продемонстрировано их AUC (таблица 1), резко снижались, когда жидкую пищу вводили в тощую кишку.

Корреляции между AUC глюкозы, AUC инсулина, OGIS, Hsp70 и GRP78 представлены в таблице 2 ниже.

		AUC глюкозы	AUC инсулина	отношение AUC G/I	OGIS	AUC Hsp70	AUC GRP78	AUC GLP1
AUC глюкозы	Коэфф-т корреляции	1.000	.622(*)	.182	-.986(**)	.874(**)	.937(**)	-.587(*)
	Уровень значимости Sig. (2- tailed)	.	.031	.572	.000	.000	.000	.045
	N	12	12	12	12	12	12	12
AUC инсулина	Коэфф-т корреляции	.622(*)	1.000	-.622(*)	-.650(*)	.720(**)	.706(*)	-.245
	Уровень значимости Sig. (2- tailed)	.031	.	.031	.022	.008	.010	.443
	N	12	12	12	12	12	12	12
Отношение AUC G/I	Коэфф-т корреляции	.182	-.622(*)	1.000	-.140	-.028	.035	-.217
	Уровень значимости Sig. (2- tailed)	.572	.031	.	.665	.931	.914	.499
	N	12	12	12	12	12	12	12
OGIS	Коэфф-т	-.986(**)	-.650(*)	-.140	1.000	-.888(**)	-.944(**)	.636(*)

	корреляции							
	Уровень значимости Sig. (2-tailed)	.000	.022	.665	.	.000	.000	.026
	N	12	12	12	12	12	12	12
AUC Hsp70	Коэфф-т корреляции	.874(**)	.720(**)	-.028	.888(**)	1.000	.930(**)	-.566
	Уровень значимости Sig. (2-tailed)	.000	.008	.931	.000	.	.000	.055
	N	12	12	12	12	12	12	12
AUC GRP78	Коэфф-т корреляции	.937(**)	.706(*)	.035	.944(**)	.930(**)	1.000	-.566
	Уровень значимости Sig. (2-tailed)	.000	.010	.914	.000	.000	.	.055
	N	12	12	12	12	12	12	12
AUC GLP1	Коэфф-т корреляции	-.587(*)	-.245	-.217	.636(*)	-.566	-.566	1.000
	Уровень значимости Sig. (2-tailed)	.045	.443	.499	.026	.055	.055	.
	N	12	12	12	12	12	12	12

**Таблица 2:** Корреляции Спирмена. \*Корреляция значима на уровне 0,05 (с двусторонней проверкой). \*\*Корреляция значима на уровне 0,01 (с двусторонней проверкой).

#### Исследования на животных

Крысы с Sleeveballoon (крысы, которым был имплантирован Sleeveballoon), имели массу тела, которая была значительно ( $P < 0,0001$ ) ниже, чем у ложноперирированных крыс (фигура 6).

Животные с Sleeveballoon имели концентрации глюкозы в крови после OGTT гораздо ниже, чем ложноперирированные (фигура 7А). Даже уровни циркулирующего инсулина, как натощак, так и после OGTT, были значительно ниже (фигура 7В). В предыдущих экспериментах изобретатели обнаружили, что при индивидуальной инфузии как GRP78, так и Hsp70 способны вызывать резистентность к инсулину (данные не представлены).

Непрерывная инфузия Hsp70 и GRP78 крысам со стандартной диетой увеличивала гликемию натощак и после OGTT, делая их похожими на ложноперирированных крыс (фигура 7А). Напротив, непрерывная инфузия

моноклональных антител против Hsp70 и GRP78 крысам с HFD резко улучшала уровни глюкозы (фигура 7А).

На фигуре 7В показано, что уровни инсулина увеличивались, когда белки теплового шока вводили крысам со стандартной диетой, и что инфузия моноклональных антител снижала уровни циркулирующего инсулина у крыс с HFD. Наконец, на фигуре показано, что эффекты Sleeveballoon были сведены на нет при одновременной инфузии Hsp70 и GRP78.

НОМА-IR и AUC глюкозы и инсулина были значительно ниже у крыс с Sleeveballoon, чем у ложноперированных крыс (таблица 3).

			Среднее	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка	Значимость	Значимость с учетом поправки Бонферрони
pAкт печени	0	7	.5900	.10786	.04077		
	1	7	.6243	.15512	.05863	1.000	
	2	7	.6357	.16752	.06332	0.999	
	3	7	1.7200	.62671	.23687	<0.0001	<0.001
	4	7	1.6671	.51874	.19607	<0.0001	<0.001
pAкт мышц	0	7	.5057	.14593	.05516		
	1	7	.5200	.17321	.06547	1.000	
	2	7	.5486	.13422	.05073	0.999	
	3	7	1.5771	.34606	.13080	<0.0001	<0.001
	4	7	1.3514	.53502	.20222	<0.0001	<0.001
НОМА_IR	0	7	24.0301	13.23024	5.00056		
	1	7	17.1593	8.12517	3.07103	0.406	
	2	7	17.6165	2.55167	.96444	0.474	
	3	7	7.7608	2.78259	1.05172	0.002	0.008
	4	7	9.2233	2.57018	.97144	0.005	0.020
AUC глюкозы	0	7	72905.7143	22528.92722	8515.13411		
	1	7	67015.5571	22585.54150	8536.53229	0.953	
	2	7	64531.4286	10927.52096	4130.21470	0.851	
	3	7	34771.4286	7123.35461	2692.37497	0.001	0.004
	4	7	38214.2857	5441.79767	2056.80619	0.002	0.008
AUC инсулина	0	7	701.65257	209.237892	79.084490		
	1	7	578.60000	182.278048	68.894626	0.513	
	2	7	566.63143	44.227521	16.716432	0.421	
	3	7	242.74286	100.526727	37.995531	<0.0001	<0.001
	4	7	325.27143	123.562005	46.702048	<0.0001	<0.001
GLP1	0	7	3.70	0.86	0.32		
	1	7	4.21	0.61	0.23	0.310	
	2	7	4.11	0.79	0.30	0.176	
	3	7	5.53	1.31	0.50	0.028	0.112
	4	7	5.34	1.08	0.41	0.028	0.112

**Таблица 3:** фосфорилированный Akt в скелетных мышцах и печени, уровни HOMA-IR, AUC глюкозы и инсулина, и GLP1 (последний измерен через +180 мин) после кривой нагрузки глюкозой. Сообщается о значимости с учетом поправки на вывод Бонферрони.

Таким образом, изобретатели обнаружили, что инфузия Hsp70 и GRP78 имитирует эффекты HFD на контроль гликемии и сводит на нет эффекты обхода двенадцатиперстной кишки, вызванные Sleeveballoon. Введение моноклональных антител против двух белков теплового шока предупреждает развитие резистентности к инсулину и диабета.

Уровни GLP1 в конце пероральной нагрузки глюкозой значительно не различаются, после коррекции Бонферрони, во всех группах по сравнению с ложнооперированными (таблица 3).

У крыс с HFD Sleeveballoon резко снижает накопление эктопического жира в печени, аналогично инфузии антител против Hsp70 и GRP78 (фигура 8), тогда как инфузия Hsp70 и GRP78 у крыс с нормальной диетой вызывает NAFLD аналогично ложнооперированным крысам (данные не показаны).

Как в мышцах (фигура 9), так и в печени (фигура 10) Akt, фосфорилированный по Ser 473, был значительно выше у крыс с Sleeveballoon, чем у ложнооперированных крыс, и у крыс, получавших анти-Hsp70 и анти-GRP78 антитела, плюс HFD, чем у крыс, которым вводили Hsp70 и GRP78, и со стандартной диетой. Эффект Sleeveballoon на Akt был сведен на нет инфузией Hsp70 и GRP78. Аналогичные данные были получены с фосфорилированием GSK (данные не показаны).

Исследование NASH и фиброза печени

#### СПОСОБЫ

Взрослых крыс-самцов линии Wistar (n=24) кормили диетой с высоким содержанием жиров и дефицитом холина, определяемой с помощью L-аминокислот (CDAА), которая индуцирует NASH и фиброз печени в течение 6 недель (возраст 90 дней в конце обработки). Крысам через подкожную помпу непрерывно вводили моноклональные антитела (MA) Hsp70/GRP78 (n=12) или жидкость, в которой разводят антитела (контрольный носитель) (n=12), как описано выше.

В конце исследования крыс умерщвляли, как описано ранее. Два среза печени (примерно 20×5×2 см) брали из правой средней доли и левой боковой доли и фиксировали в течение 24 ч в формалине, а затем заливали парафином. Затем ткань разрезали на срезы толщиной 5 мкм, помещали на предметное стекло и окрашивали

сириусом красным (насыщенный раствор пикриновой кислоты, содержащий 0,1% Direct Red 80 и 0,1% Fast Green FCF) для визуализации отложения коллагена. Дополнительные срезы ткани альтернативно окрашивали гематоксилином/эозином. Патолог не был осведомлен о дизайне исследования и результатах визуализации (группы животных).

Показатель по шкале фиброза при NAFLD (NAFLD Fibrosis Score, NAS)) рассчитывали в соответствии с критериями Кляйнера на срезах, окрашенных гематоксилином/эозином Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41: 1313–1321).

Количественное определение коллагена проводили с помощью морфометрической системы [компьютеризированная морфометрическая система Life Science (BIOQUANT, USA)] на 36 изображениях на каждое животное при 100-кратном увеличении (4 окрашенных пикросириусом красным среза на каждое животное, девять изображений, взятых случайным образом на каждый срез).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В конце исследования масса тела статистически не различалась в двух группах (318,17±24,79 против 320,67±22,01 г (P=0,796) крыс, получавших моноклональные антитела против Hsp70/GRP78, и у крыс, которым вводили контрольный носитель.

В таблице 4 представлены отдельные компоненты шкалы активности NAFLD (NAFLD activity score, NAS), которая оценивает три гистологических компонента NASH, а именно, стеатоз, лобулярное воспаление и баллонирование, а также среднее значение±SD NAS и статистическая значимость (U-критерий Манна-Уитни).

Показатель	Моноклональные антитела против Hsp70/GRP78	Контрольный носитель
Стеатоз	Кол-во крыс	Кол-во крыс
0	5	0
1	6	5
2	1	7
3	0	0
Лобулярное воспаление		
0	4	0
1	6	1
2	2	10
3	0	1
Баллонирование		

гепатоцитов		
0	2	0
1	5	0
2	4	1
3	1	11
Шкала активности NAFLD (NAFLD activity score, NAS)	2,83±1,53	5,83±1,11
Значимость NAS	P<0,0001	

Таблица 4: Показатели стеатоза, лобулярного воспаления, баллонирования гепатоцитов вместе со шкалой активности NAFLD (NAFLD activity score, NAS), средним значением±SD

Инфузия моноклональных антител против Hsp70/GRP78 во время индуцированного диетой NASH/фиброза резко уменьшала гистологические признаки NASH, а также фиброза печени.

#### ВВЕДЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ HSP70 И/ИЛИ GRP78 ИЛИ ИХ АНТИТЕЛ

Авторы изобретения обнаружили, что при введении рекомбинантных белков HSP70 или GRP78 в виде непрерывной инфузии крысам или при введении их моноклональных антител наблюдаются меньшие эффекты, чем при одновременном введении. Другими словами, при совместном введении наблюдается усиление их эффектов. Однако, также, отдельные введения моноклональных антител, направленных против HSP70 или против GRP78, демонстрируют значительный эффект в отношении снижения резистентности к инсулину.

На фигурах 13 и 14 показаны кривые гликемии и инсулинемии после OGTT у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложно оперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + антитело против HSP70 и HFD + Sleeveballoon + рекомбинантный белок HSP70 (rHSP70), по сравнению с введением обоих антител или рекомбинантных белков.

Кривые HFD + ложнооперированные и HFD + Sleeveballoon + rHSP70 существенно не различаются (ANOVA для повторных измерений), как и кривые HFD + Sleeveballoon и HFD + антитело против HSP70. Для GRP78 кривые HFD + ложнооперированные и HFD + Sleeveballoon + rHSP70 значительно различаются (P



<0,05) на 2 балла для гликемии и 3 балла для инсулинемии (ANOVA для повторных измерений).

Имплантация Sleeveballoon резко снижает гликемию и инсулинемию, несмотря на диету с высоким содержанием жиров, тогда как HFD в сочетании с моноклональным антителом, направленным против HSP70 или GRP78, улучшает гликемию и, соответственно, снижает секрецию инсулина и резистентность к инсулину. Напротив, когда рекомбинантный белок HSP70 или GRP78 вводят путем инфузии животным, которые благодаря наличию Sleeveballoon стали чувствительными к инсулину, чувствительность к инсулину ухудшается, и они становятся резистентными к инсулину.

	HOMA-IR	AUC глюкозы (г/дл·мин)	AUC инсулина (мкЕД/мл·мин)
HFD + Ложнооперированные	20,36±3,58	70473,23±17641,47	14342,30±6943,04
HFD + Sleeveballoon	6,00±1,61	37230,03±7907,00	4724,20±2604,41
HFD + Sleeveballoon + rHSP70	16,29±2,63	63941,99±8685,76	11086,90±1221,8
HFD + анти-HSP70 антитела	8,93±0,30	39214,3±5804,9	6685,01±3031,05
HFD + Ложнооперированные	19,31±1,62	72905,7±22984,1	11720,1±3059,4
HFD + Sleeveballoon	6,12±0,17	34771,4±7325,3	5175,3±648,2
HFD + Sleeveballoon + rGRP78	15,19±0,64	67015,6±23111,8	9106,5±5835,1
HFD + анти-GRP78 антитела	10,87±3,01	42223,48±7916,29	8592,6±3236,5

Таблица 5: Индекса инсулинорезистентности (HOMA-IR) и значения площади под кривой (AUC) гликемии и инсулинемии в экспериментах с взятыми по отдельности HSP70 или GRP78.

HFD + Sleeveballoon против HFD + Ложнооперированные: P <0,001

HFD + антитела против HSP70 против HFD + Ложнооперированные: P <0,01

HFD + антитела против GRP78 против HFD + Ложнооперированные: P <0,05

На фигуре 15 показано содержание гликогена, выделенное окрашиванием PAS в скелетных мышцах и печени у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложнооперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-HSP70 антитело и HFD + Sleeveballoon + рекомбинантный белок HSP70 (rHSP70).

На фигуре 16 показано содержание липидов (выделено окрашиванием ORO) в скелетных мышцах и печени у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложнооперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-HSP70 антитело и Sleeveballoon + рекомбинантный белок HSP70 (rHSP70).

На фигуре 17 показано содержание гликогена, выделенное окрашиванием PAS в скелетных мышцах и печени у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложнооперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-GRP78 антитело и HFD + Sleeveballoon + рекомбинантный белок GRP78 (rGRP78).

На фигуре 18 показано содержание липидов (выделено окрашиванием ORO) в скелетных мышцах и печени у крыс, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD) и ложнооперированных, HFD + Sleeveballoon, HFD + анти-GRP78 антитело и Sleeveballoon + рекомбинантный белок GRP78 (rGRP78).

Введение HSP70 или GRP78 в виде рекомбинантных белков или в виде моноклональных антител оказывает значительное влияние на сигнал инсулина, как видно из фигуры 19. Введение моноклональных антител против HSP70 или GRP78 в присутствии HFD значительно увеличило фосфорилирование Akt по остатку серина в положении 473, тогда как введение рекомбинантного белка крысам с Sleeveballoon значительно снизило фосфорилирование, но с более высокими значениями значимости в случае HSP70 ( $P < 0,01$ ), чем в случае GRP78 ( $P < 0,05$ ).

### **Биопсия тощей кишки**

Образцы ткани тощей кишки методом биопсии получали во время энтероскопии у 7 пациентов с гистологически подтвержденным NASH, ожирением и резистентностью к инсулину, и у 7 здоровых добровольцев.

### **Оценка чувствительности к инсулину**

Чувствительность к инсулину оценивали с помощью гиперинсулинемического эугликемического клэмп-метода (DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237: E214–E223). Чувствительность к инсулину определяли во время последних 40 минут клэмп-теста путем вычисления количества введенной глюкозы ( $M$ ,  $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{кг}_{\text{массы тела}}^{-1}$ ), необходимого для поддержания эугликемии, то есть гликемии в нормальном диапазоне, измеренной натощак.

### **Секреция кишечного белка**

Полученные методом биопсии образцы слизистой оболочки тощей кишки промывали солевым раствором и половину использовали для измерения

внутриклеточных белков, а половину инкубировали в оксигенированном ( $O_2:CO_2$ , 95:5, об./об.) растворе Кребса-Хенселейта (37 °C, pH 7,4) *in vitro* в течение 1 ч для выделения белков, секретируемых в среду (секретом). Кондиционированную среду лиофилизировали и хранили при -80 °C для последующей очистки белков.

### **Протеомика**

Белки переваривали трипсином, метили TMT8plex, включая внутренний стандарт, с последующим фракционированием SCX и анализом LC-MS/MS (MS3) (система EASY-nLC II NSI Orbitrap Velos (Thermo)). Программное обеспечение Proteome Discoverer 1.3 (Thermo) использовали для обработки данных и идентификации белков.

**DI:** Отношение дифференциальной интенсивности, определяемое как возведенная в степень разница средних значений интенсивности между представляющей интерес группой (группа А) и основной группой (группа В).

Цвета указывают направление и амплитуду изменений.

Повышение уровней белка в группе А (пациенты с NASH, резистентностью к инсулину и ожирением) по сравнению с контролями выражается в различных оттенках красного, тогда как снижение уровней данного белка выражается в оттенках синего.

**p-Значение:** статистическая значимость ( $p \leq 0,05$ ) уровня пептида.

**q-Значение:** скорректированное p-значение для корректировки на многократное тестирование с использованием метода Storey (серое затенение:  $p \leq 0,05$ ).

**DR\_A:** частота обнаружения (detection rate, DR) в группе А, определяемая как доля образцов с интенсивностью, большей или равной пороговому значению интенсивности.

**DR\_B:** частота обнаружения (detection rate, DR) в группе В, определяемая как доля образцов с интенсивностью, большей или равной пороговому значению интенсивности.

### **Результаты**

Пациенты с NASH имели значительно более высокий вес и BMI, а также значительно более низкое поглощение глюкозы, опосредованное инсулином, чем здоровые люди из контрольной группы, но были сопоставимы по росту, возрасту и полу. Средний балл по шкале оценки степени фиброза (NAFLD Fibrosis Score, NAS) составил  $4,43 \pm 1,27$ , что указывает на гистологическое присутствие NASH (таблица 6).

Протеомные данные представлены в виде отношения пациенты/контроли, следовательно, значение  $>1$  указывает на увеличение экспрессии определенного белка

у пациентов по сравнению с контролями, и наоборот. Уровни GRP74 и GRP78, а также членов семейства HSP70, все были увеличены в кондиционированной среде у субъектов с ожирением, резистентностью к инсулину и NASH по сравнению со

Пациенты	Рост (см)	Вес (кг)	ВМІ (кг/м <sup>2</sup> )	Возраст (лет)	Пол (0-Ж, 1-М)	М (мг/кг/мин)	NAS
1	161	98	37,81	45	0	4,12	3
2	185	135	39,44	36	1	2,79	5
3	156	102	41,91	52	0	3,15	4
4	168	146	51,73	61	0	1,56	6
5	180	127	39,20	45	1	3,27	4
6	164	110	40,90	57	0	4,11	3
7	179	148	46,19	49	1	1,39	6
	<b>170,43</b>	<b>123,71</b>	<b>42,45</b>	<b>49,29</b>	<b>0,43</b>	<b>2,91</b>	<b>4,43</b>
	<b>10,97</b>	<b>20,60</b>	<b>4,90</b>	<b>8,34</b>	<b>0,53</b>	<b>1,10</b>	<b>1,27</b>
Контроли	Рост (см)	Вес (кг)	ВМІ (кг/м <sup>2</sup> )	Возраст (лет)	Пол (0 Ж, 1-М)	М (мг/кг/мин)	NAS
1	185	85	24,84	47	1	6,54	0
2	192	92	24,96	53	1	6,26	0
3	164	55	20,45	62	0	9,15	1
4	158	57	22,83	35	0	8,31	0
5	169	61	21,36	41	0	8,55	1
6	170	70	24,22	55	0	7,15	0
7	183	83	24,78	53	1	6,96	0
	<b>174,43</b>	<b>71,86</b>	<b>23,35</b>	<b>49,43</b>	<b>0,43</b>	<b>7,56</b>	<b>0,29</b>
	<b>12,39</b>	<b>14,88</b>	<b>1,84</b>	<b>9,13</b>	<b>0,53</b>	<b>1,11</b>	<b>0,49</b>
Значимость	0,535	0,000	0,000	0,976	1,000	0,000	0,000

здоровыми контролями.

Таблица 6: Антропометрические данные, количество глюкозы, введенной во время клэмп-теста, и NAS.

Таблица 7, в которой показано отношение дифференциальной интенсивности, демонстрирует, что уровни GRP78, но также и GRP74, полученные в результате делеции С-концевого мотива KDEL, являются более высокими в секрете слизистой оболочки кишечника у субъектов с ожирением, резистентностью к инсулину и NASH по сравнению со здоровыми добровольцами. Известно, что отсутствие С-концевого мотива KDEL делает возможной секрецию GRP78. Это может объяснить высокий

уровень GRP78 в кровотоке у людей после диеты с высоким содержанием жиров и сахаразы.

SRP75, HSP71, HSP74 и HSP76 принадлежат, как упоминалось выше, к семейству HSP70.

Секретом слизистой оболочки тощей кишки						
UNIPROT_ID	ИЗОТОП_ГРУППА_ID	DI	p-Значение	q-Значение	DR_A	DR_B
GRP75_HUMAN	1_151285325	1.18	0	0	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151286460	1.09	0.007	0.005	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151286659	1.23	0.006	0.005	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151288525	1	0.996	0.229	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151289564	1.05	0.074	0.03	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151290255	0.93	0.009	0.006	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151290768	1.06	0.222	0.069	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151291634	1.01	0.971	0.224	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151292646	1.08	0.095	0.037	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151292971	0.98	0.472	0.126	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151293108	1.02	0.446	0.121	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151293875	1.02	0.545	0.142	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151295229	1.05	0.419	0.115	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151297111	1.01	0.769	0.187	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151298313	0.94	0.054	0.024	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151299831	0.93	0.001	0.001	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151300138	1.16	0.003	0.003	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151300866	1.14	0	0	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151301374	1.56	0.44	0.119	100%	80%
GRP75_HUMAN	1_151302086	1.04	0.252	0.077	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151303210	0.93	0.132	0.047	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151306012	0.87	0	0.001	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151307335	0.83	0.002	0.002	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151312351	1.08	0.102	0.039	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151312977	0.97	0.116	0.042	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151317325	0.85	0.005	0.004	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151319290	1.16	0.013	0.008	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151319609	1.07	0.002	0.002	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151321822	0.9	0.004	0.004	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151323647	1.04	0.252	0.077	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151323761	1.04	0.199	0.064	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151325995	1.14	0.006	0.005	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151328225	0.9	0	0	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151330125	1.14	0	0	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151331925	1.11	0.003	0.003	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151332045	1.58	0.367	0.103	100%	80%
GRP75_HUMAN	1_151334817	0.88	0.003	0.003	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151335106	1.06	0.141	0.049	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151336465	0.98	0.715	0.177	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151338989	1.56	0.403	0.111	100%	80%
GRP75_HUMAN	1_151342397	2.48	0.369	0.104	80%	40%
GRP75_HUMAN	1_151342846	1.94	0.106	0.04	100%	80%
GRP75_HUMAN	1_151350305	1	0.943	0.219	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151361253	0.98	0.711	0.176	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151376139	0.55	0.231	0.072	80%	100%
GRP75_HUMAN	1_151384132	0.92	0.004	0.004	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151391976	1.06	0.16	0.054	100%	100%
GRP75_HUMAN	1_151412802	0.76	0.695	0.173	80%	80%
GRP75_HUMAN	1_151467020	0.56	0.475	0.127	80%	100%
GRP75_HUMAN   HS71L_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151305867	1.02	0.729	0.179	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151279033	0.95	0.005	0.004	100%	100%

GRP78_HUMAN	1_151279282	0.99	0.737	0.181	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151279311	0.88	0	0	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151279342	1.1	0.034	0.017	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151279774	0.92	0	0	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151279839	0.85	0.001	0.002	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151279976	0.86	0	0	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151280260	1	0.891	0.21	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151280428	1.13	0	0	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151280990	1.2	0.003	0.003	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151281794	1.09	0.05	0.022	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151281797	0.92	0.001	0.002	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151281832	0.85	0.05	0.023	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151281859	0.91	0.003	0.003	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151281875	0.98	0.493	0.131	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151282421	0.97	0.46	0.124	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151282980	1.07	0.12	0.044	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151282986	1.09	0.025	0.014	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151283009	1.11	0.048	0.022	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151283688	0.89	0.002	0.002	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151284258	0.94	0.133	0.047	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151284415	1.03	0.305	0.089	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151284428	1.08	0.011	0.007	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151284566	0.85	0	0.001	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151285336	1.04	0.338	0.097	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151286034	0.82	0	0.001	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151286131	1.07	0.029	0.015	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151286306	1.12	0	0	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151286905	1.1	0.04	0.019	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151287722	1.14	0.001	0.001	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151287921	1.07	0.014	0.009	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151288811	0.9	0.019	0.011	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151289310	0.92	0.069	0.029	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151289555	0.85	0.001	0.001	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151289571	1	0.991	0.228	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151289687	1.05	0.078	0.032	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151290129	0.89	0.001	0.001	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151290214	0.91	0.074	0.03	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151293867	1.11	0.021	0.012	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151293893	1.03	0.122	0.044	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151295908	0.48	0.032	0.016	80%	100%
GRP78_HUMAN	1_151298346	1.06	0.466	0.125	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151298698	0.93	0.014	0.009	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151300075	1.09	0.04	0.019	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151301112	1.05	0.481	0.128	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151301216	1.08	0.069	0.029	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151301503	1.26	0	0.001	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151304761	0.87	0.009	0.006	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151307624	0.97	0.189	0.061	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151312826	0.77	0.014	0.009	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151312863	1.26	0	0	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151313164	1.13	0.007	0.005	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151313440	1.09	0.009	0.006	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151315499	0.92	0.03	0.015	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151318943	1.07	0.079	0.032	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151320855	0.93	0.055	0.024	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151323025	1.02	0.453	0.122	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151323115	1.08	0.182	0.06	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151326899	0.91	0.023	0.012	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151330851	2.01	0.089	0.035	100%	80%
GRP78_HUMAN	1_151334552	1.04	0.125	0.045	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151339699	0.52	0.083	0.033	80%	100%
GRP78_HUMAN	1_151340284	0.26	0.026	0.014	60%	100%

GRP78_HUMAN	1_151340734	<b>1.01</b>	0.689	<b>0.171</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151341209	0.91	<b>0.029</b>	<b>0.015</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151344985	<b>1.65</b>	0.267	<b>0.08</b>	100%	80%
GRP78_HUMAN	1_151356082	<b>2.66</b>	0.259	<b>0.078</b>	100%	60%
GRP78_HUMAN	1_151360302	<b>1.75</b>	0.172	<b>0.057</b>	100%	80%
GRP78_HUMAN	1_151361192	<b>1.15</b>	<b>0.022</b>	<b>0.012</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151361280	<b>1.05</b>	<b>0.02</b>	<b>0.012</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151362224	<b>1.04</b>	0.228	<b>0.071</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151365138	<b>1.16</b>	<b>0.004</b>	<b>0.003</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151372391	<b>1.11</b>	<b>0.042</b>	<b>0.02</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151372470	<b>1.06</b>	0.266	<b>0.08</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151380303	<b>1.05</b>	0.083	<b>0.033</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151380448	<b>2.21</b>	<b>0.031</b>	<b>0.016</b>	100%	80%
GRP78_HUMAN	1_151385580	<0.1	<b>0</b>	<b>0</b>	0%	100%
GRP78_HUMAN	1_151387395	0.94	<b>0.021</b>	<b>0.012</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151389638	0.93	<b>0.016</b>	<b>0.01</b>	100%	100%
GRP78_HUMAN	1_151396266	<b>2.53</b>	0.192	<b>0.062</b>	80%	40%
GRP78_HUMAN	1_151425935	0.57	0.179	<b>0.059</b>	80%	100%
GRP78_HUMAN	1_151434071	0.8	<b>0</b>	<b>0.001</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151284471	0.98	0.663	<b>0.166</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151286296	0.96	<b>0.018</b>	<b>0.011</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151289932	0.9	0.12	<b>0.044</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151291763	<b>1.08</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151291945	0.99	0.908	0.213	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151293865	0.99	0.747	<b>0.183</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151302732	0.95	0.153	<b>0.052</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151339138	0.89	<b>0.024</b>	<b>0.013</b>	100%	100%
HSP71_HUMAN	1_151345825	0.95	0.401	<b>0.111</b>	100%	100%
HSP74_HUMAN	1_151284344	0.82	<b>0</b>	<b>0</b>	100%	100%
HSP74_HUMAN	1_151298632	<b>1.2</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	100%	100%
HSP74_HUMAN	1_151322098	<b>1.72</b>	0.273	<b>0.082</b>	100%	80%
HSP74_HUMAN	1_151323221	1	0.98	0.226	100%	100%
HSP74_HUMAN	1_151327948	<b>1.75</b>	0.149	<b>0.051</b>	100%	80%
HSP74_HUMAN	1_151352921	0.94	0.242	<b>0.074</b>	100%	100%
HSP74_HUMAN	1_151353355	1	0.933	0.218	100%	100%
HSP74_HUMAN	1_151354440	0.77	<b>0</b>	<b>0</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN	1_151299336	<b>1.28</b>	0.335	<b>0.096</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151284874	0.98	0.129	<b>0.046</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151287557	<b>1.16</b>	<b>0.005</b>	<b>0.004</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151297059	<b>1.15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151314253	<b>1.08</b>	0.101	<b>0.038</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151329000	0.94	0.215	<b>0.068</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151329228	<b>5.42</b>	<b>0.008</b>	<b>0.006</b>	100%	40%
HSP76_HUMAN   HSP71_HUMAN	1_151362121	<b>1.21</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP7C_HUMAN   HSP72_HUMAN	1_151281376	0.89	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	100%	100%
HSP76_HUMAN   HSP7C_HUMAN   HSP72_HUMAN	1_151282279	0.88	<b>0</b>	<b>0.001</b>	100%	100%

### Члены семейства HSP70:

Uniprot\_ID: GRP75\_HUMAN; Описание белка: белок Stress-70, митохондриальный предшественник.

Uniprot\_ID: GRP78\_HUMAN; Описание белка: предшественник регулируемого глюкозой белка с массой 78 кДа.

Uniprot\_ID: HSP71\_HUMAN; Описание белка: белок 1A/1B теплового шока массой 70 кДа.

Uniprot\_ID: HSP76\_HUMAN; Описание белка: белок теплового шока 6 массой 70 кДа; <https://www.uniprot.org/>

Uniprot ID: HSP72 (синоним HSP70)

**DI:** Отношение дифференциальной интенсивности, определяемое как возведенная в степень разница средних значений интенсивности между представляющей интерес группой, субъектами с NASH, резистентностью к инсулину и ожирением (группа А) и контрольной группой здоровых добровольцев (группа В). Цветовое затенение значений DI является функцией направления и амплитуды наблюдаемых процентных изменений. Повышение в группе А обозначается оттенками красного, тогда как снижение обозначается оттенками синего.

**p-Значение:** статистическая значимость ( $p \leq 0,05$ ) уровня пептида.

**q-Значение:** скорректированное p-значение для корректировки на многократное тестирование с использованием метода Storey (серое затенение:  $p \leq 0,05$ ).

**DR\_A:** частота обнаружения (detection rate, DR) в группе А, определяемая как доля образцов с интенсивностью, большей или равной пороговому значению интенсивности.

**DR\_B:** частота обнаружения (detection rate, DR) в группе В, определяемая как доля образцов с интенсивностью, большей или равной пороговому значению интенсивности.



### Формула изобретения

1. Ингибиторы активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и/или ингибиторы активности белка GRP78 для применения в лечении резистентности к инсулину и/или патологий, возникающих вследствие нее или связанных с ней, при этом указанные ингибиторы активности Hsp70 выбраны из одного или нескольких моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка Hsp70 или белка, принадлежащего к семейству HSP70, молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую Hsp70 или белок, принадлежащий к семейству HSP70, и при этом указанные ингибиторы активности GRP78 выбраны из одного или нескольких моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка GRP78, молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую GRP78.

2. Ингибиторы по п. 1, где указанные белки, принадлежащие к семейству HSP70, представляют собой HSP70, HSP71, HSP76, HSP74, GRP75.

3. Ингибиторы по п. 1 или 2, где указанные молекулы интерферирующих РНК представляют собой siRNA, специфические в отношении РНК, кодирующей Hsp70 или белок, принадлежащий к семейству HSP70, и/или siRNA, специфические в отношении РНК, кодирующей GRP78.

4. Ингибиторы для применения по п. 3, где указанные siRNA выбраны из SEQ ID 1-11.

5. Ингибиторы для применения по любому из пп. 1-4, где указанные молекулы интерферирующих РНК составлены таким образом, чтобы высвободиться в кишечнике.

6. Ингибиторы для применения по любому из пп. 1-5, где указанные патологии, возникающие вследствие резистентности к инсулину или связанные с резистентностью к инсулину, представляют собой гипергликемию, диабет 2 типа, метаболический синдром, атеросклероз, синдром поликистозных яичников,

дислипидемию, ожирение, сердечно-сосудистое заболевание, гипертензию, NASH, NAFLD и фиброз печени.

7. Ингибиторы для применения по любому из пп. 1-6, где указанные ингибиторы вводят одновременно или последовательно нуждающемуся в этом пациенту.

8. Композиция, содержащая ингибиторы активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, и/или ингибиторы активности белка GRP78, и одно или несколько вспомогательных веществ или носителей, фармакологически приемлемых для применения в лечении резистентности к инсулину и/или патологий, возникающих вследствие резистентности к инсулину или связанных с ней, и при этом указанные ингибиторы активности по меньшей мере одного белка, принадлежащего к семейству Hsp70, выбраны из одного или нескольких моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка Hsp70 или белка, принадлежащего к семейству HSP70, и/или молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую Hsp70, и указанные ингибиторы активности GRP78 выбраны из одного или нескольких моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка GRP78, и/или молекул интерферирующих РНК, которые связывают исключительно мРНК, кодирующую GRP78.

9. Композиция для применения по п. 8, где указанные белки, принадлежащие к семейству HSP70, представляют собой HSP70, HSP71, HSP76, HSP74, GRP75.

10. Композиция для применения по п. 9, где указанные молекулы интерферирующих РНК представляют собой siRNA, специфические в отношении РНК, кодирующей Hsp70, или в отношении белка, принадлежащего к семейству HSP70, и/или siRNA, специфические в отношении РНК, кодирующей GRP78.

11. Композиция для применения по п. 8, где указанные siRNA выбраны из одной или нескольких последовательностей SEQ ID 1-12.

12. Композиция для применения по любому из пп. 8-11, где указанные патологии, возникающие вследствие резистентности к инсулину или связанные с резистентностью к инсулину, представляют собой гипергликемию, диабет 2 типа, метаболический синдром, атеросклероз, синдром поликистозных яичников, дислипидемию, ожирение, сердечно-сосудистое заболевание, гипертензию, NASH, NAFLD и фиброз печени.

13. Композиция для применения по любому из пп. 8-12, где указанные ингибиторы составлены совместно или обеспечены в отдельных аликвотах для одновременного или последовательного введения.

14. Композиция для применения по любому из пп. 8-13 в виде состава для перорального, системного, интраназального или внутривенного введения.

15. Композиция для применения по любому из пп. 8-14, где указанные молекулы интерферирующих РНК составлены таким образом, чтобы высвободиться в кишечнике.

16. Композиция для применения по п. 15, где указанная композиция представляет собой композицию для гастрорезистентного перорального применения.

17. Композиция для применения по п. 16, где указанная композиция содержит липидные наночастицы, нагруженные указанными молекулами интерферирующих РНК.

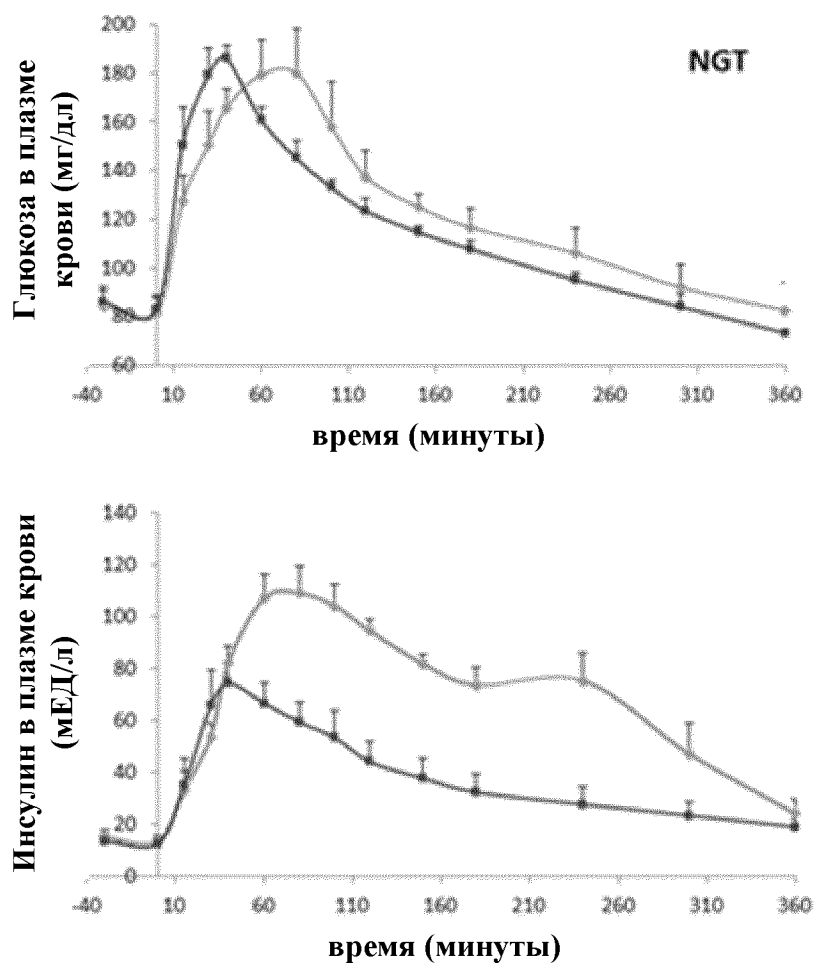
18. Композиция для применения по любому из пп. 8-14, где указанная композиция содержит одно или несколько моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка GRP78, и/или одно или несколько моноклональных антител или их фрагментов, специфических в отношении белка Hsp70 или белка, принадлежащего к семейству HSP70, составленная для подкожного введения.

19. Композиция для применения по любому из пп. 8-18, где указанные ингибиторы вводят одновременно или последовательно нуждающемуся в этом пациенту.

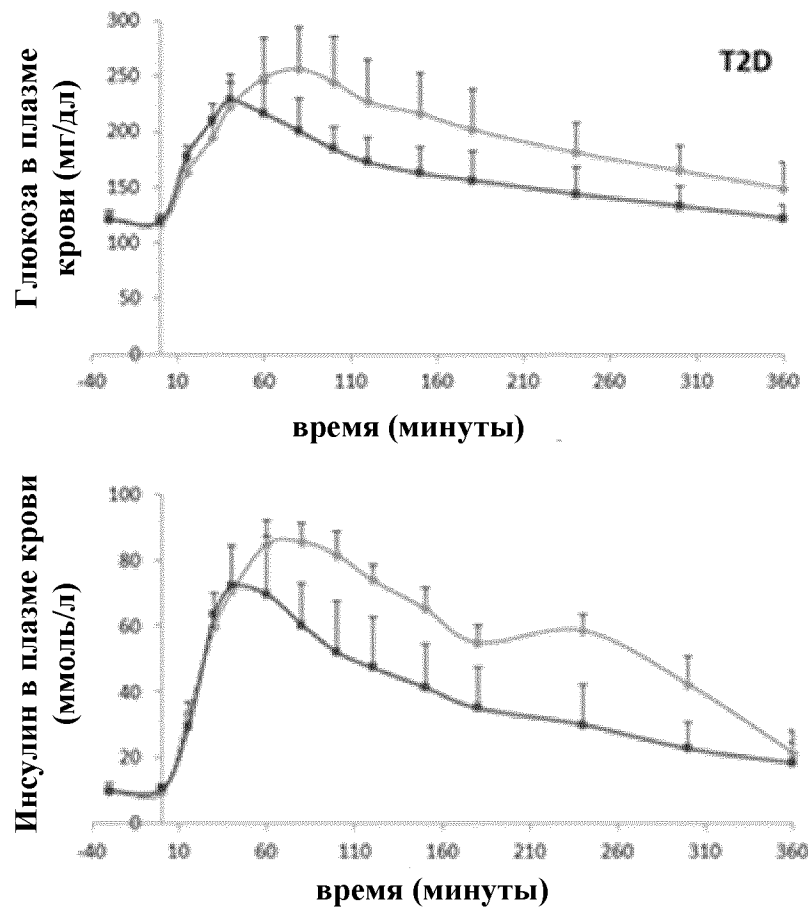
20. Композиция для применения по п. 19, где указанные антитела вводят подкожно, и указанные молекулы интерферирующих РНК вводят перорально в гастрорезистентных составах.

21. Способ диагностики резистентности к инсулину у человека, в котором:

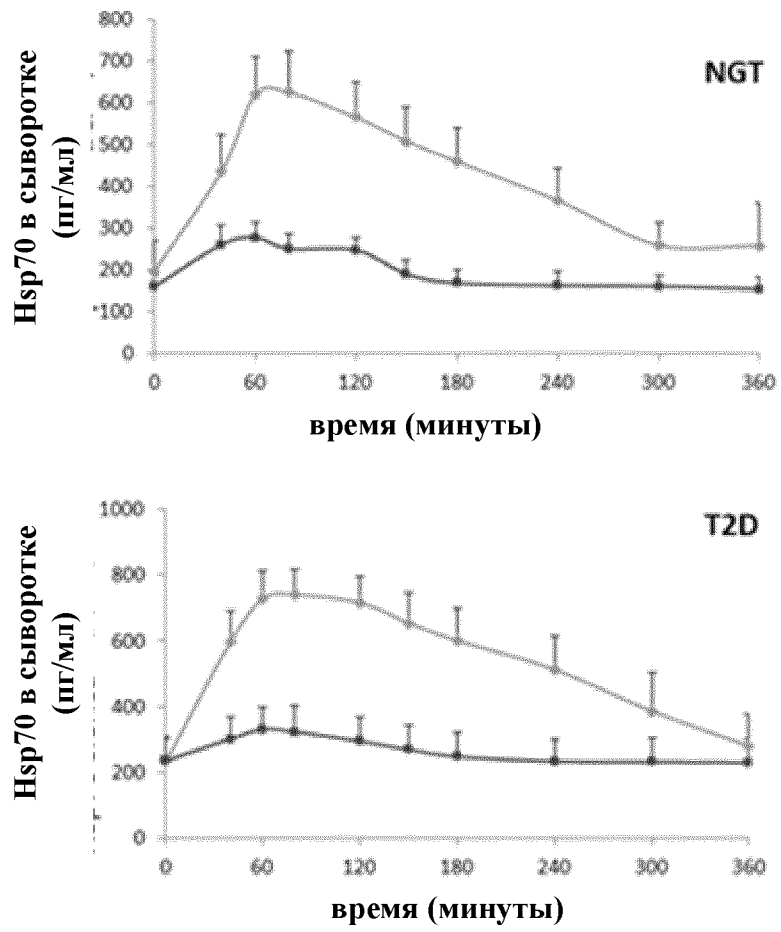
- a. измеряют концентрацию белков Hsp70 и GRP78 в образце крови,
- b. общая концентрация указанных белков в крови выше 256 пг/мл указывает на резистентность к инсулину.



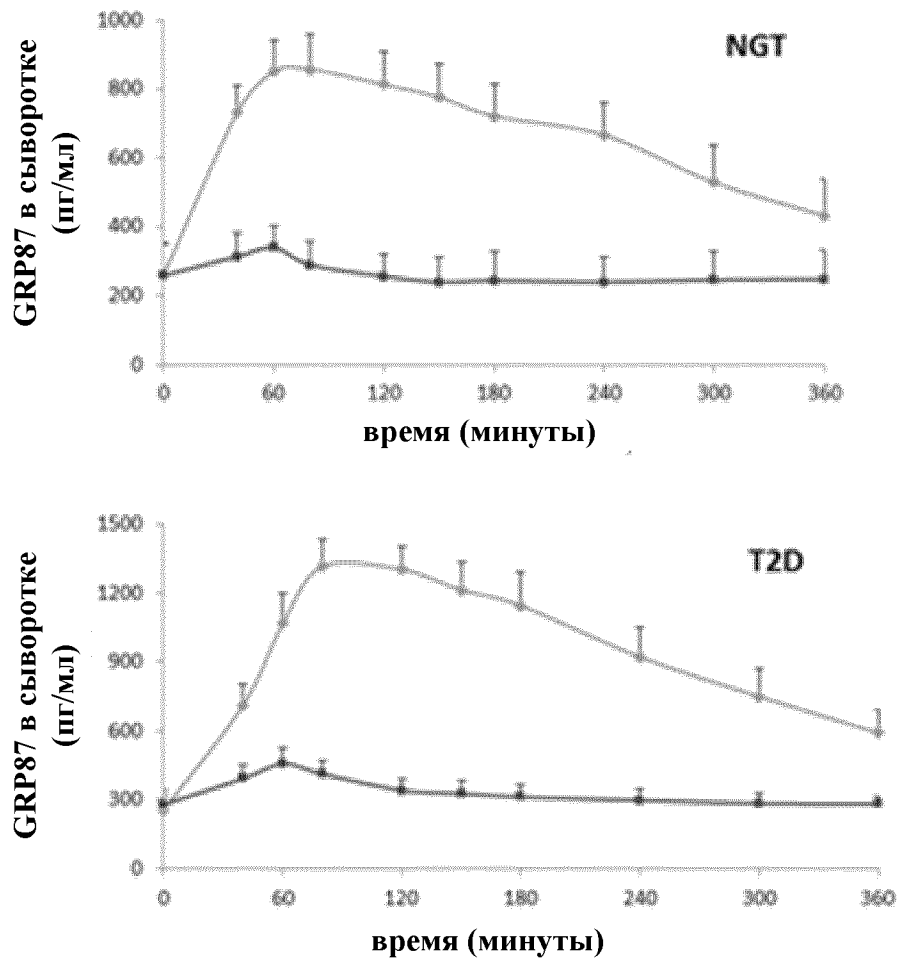
Фиг. 1



Фиг. 2

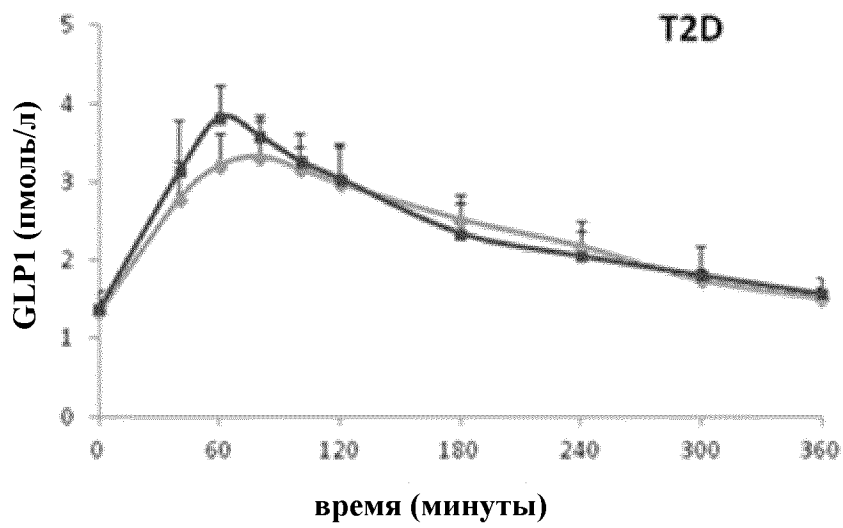
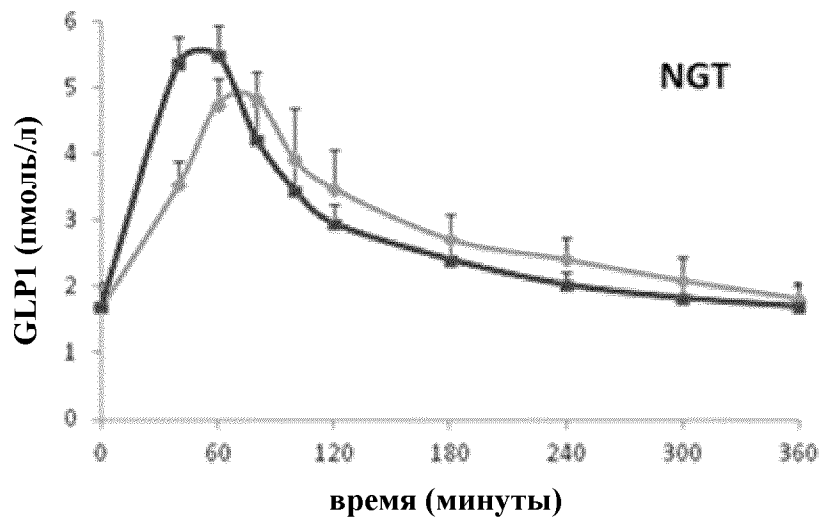


Фиг. 3

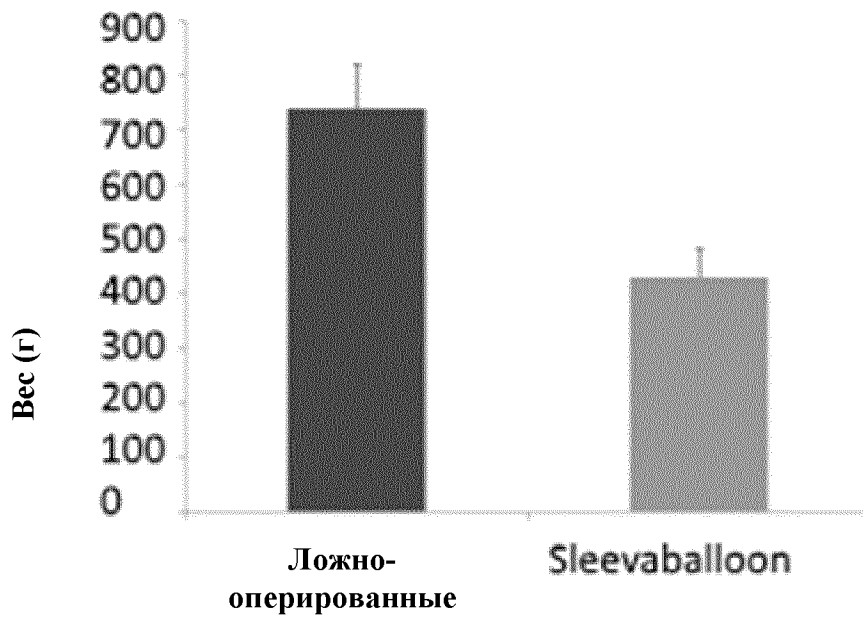


Фиг. 4

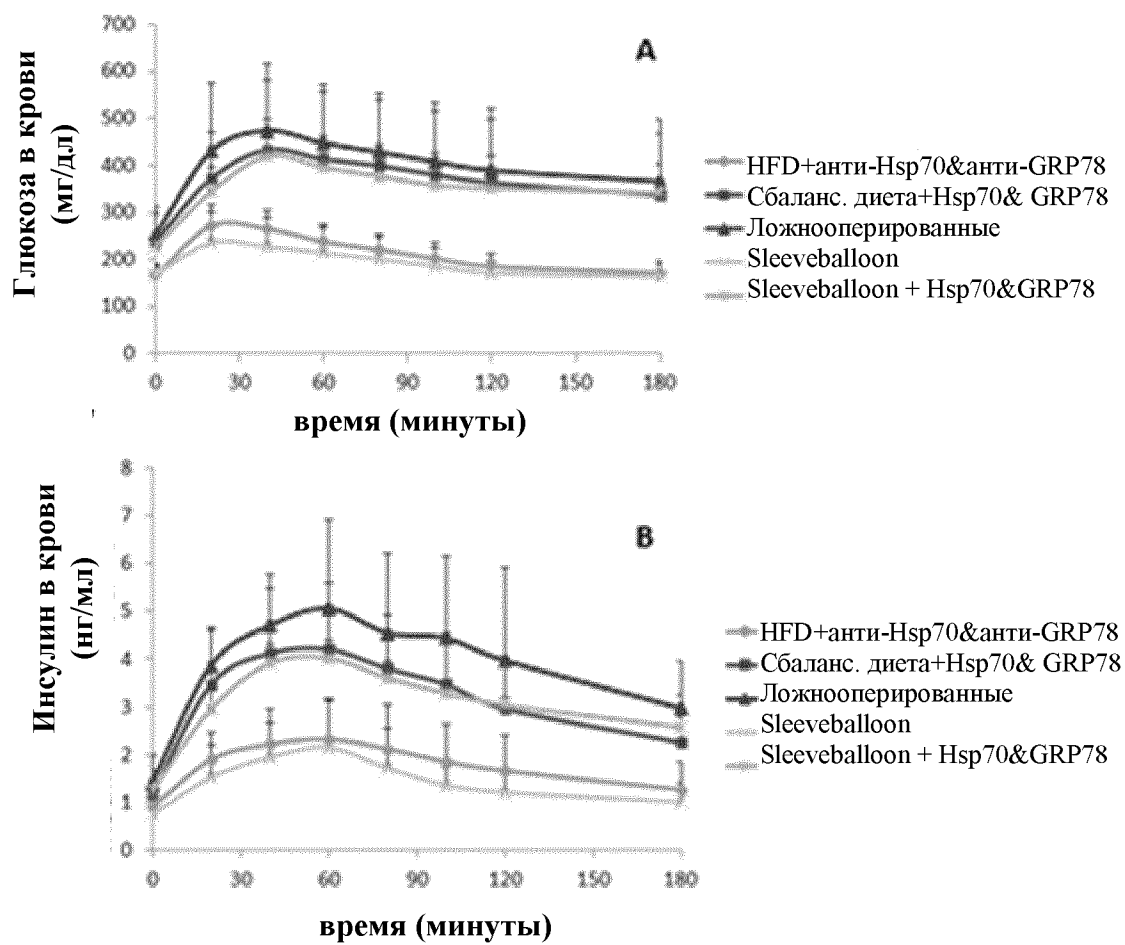




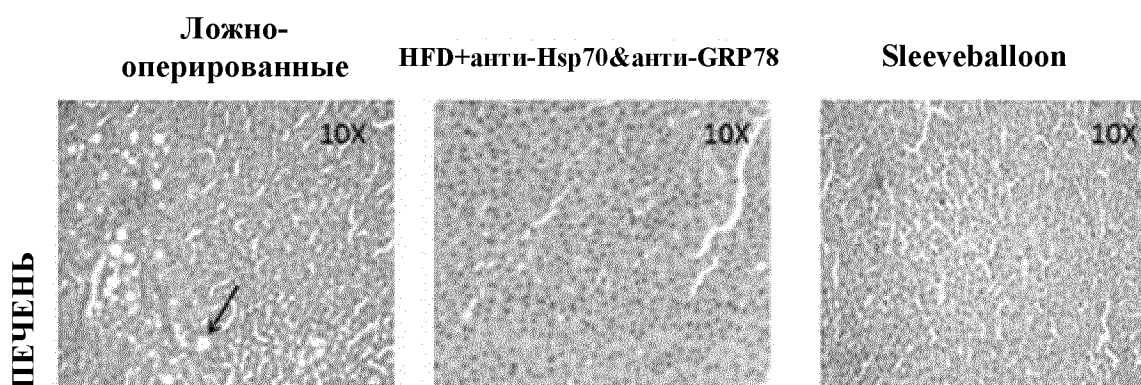
Фиг. 5



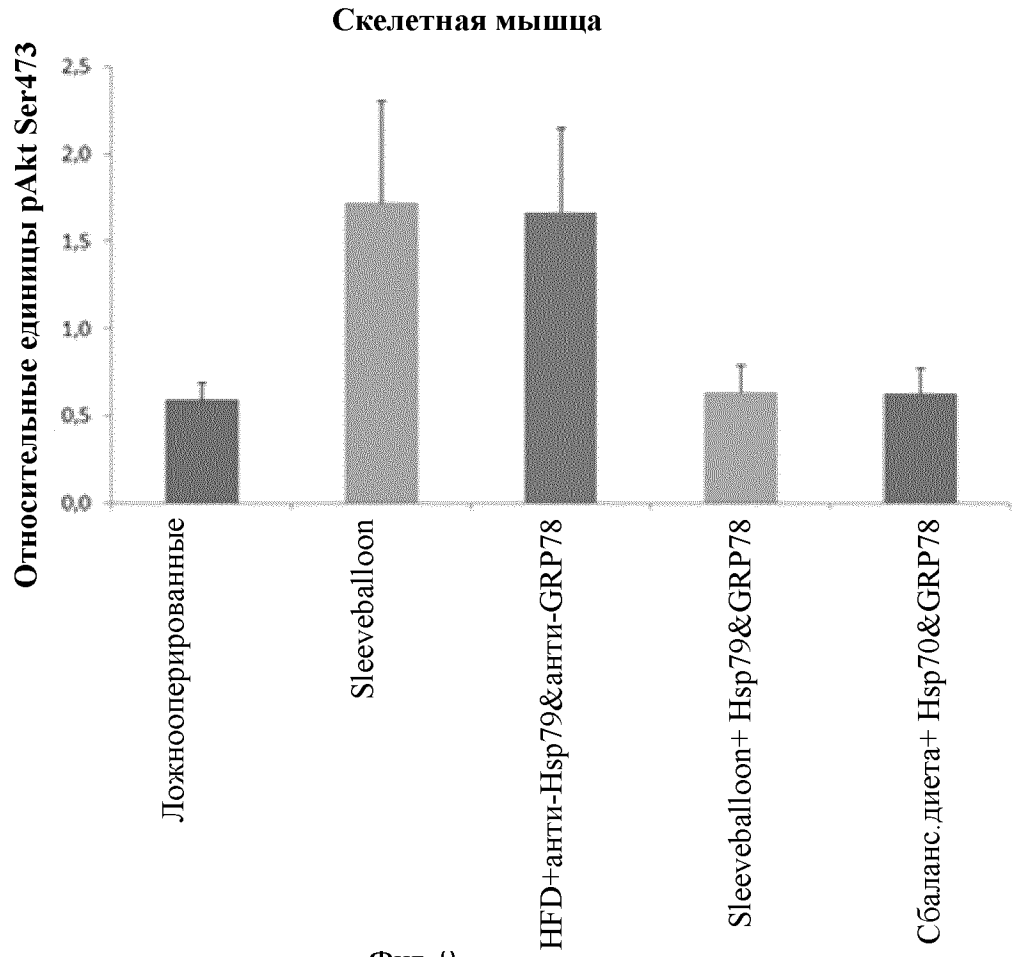
Фиг. 6

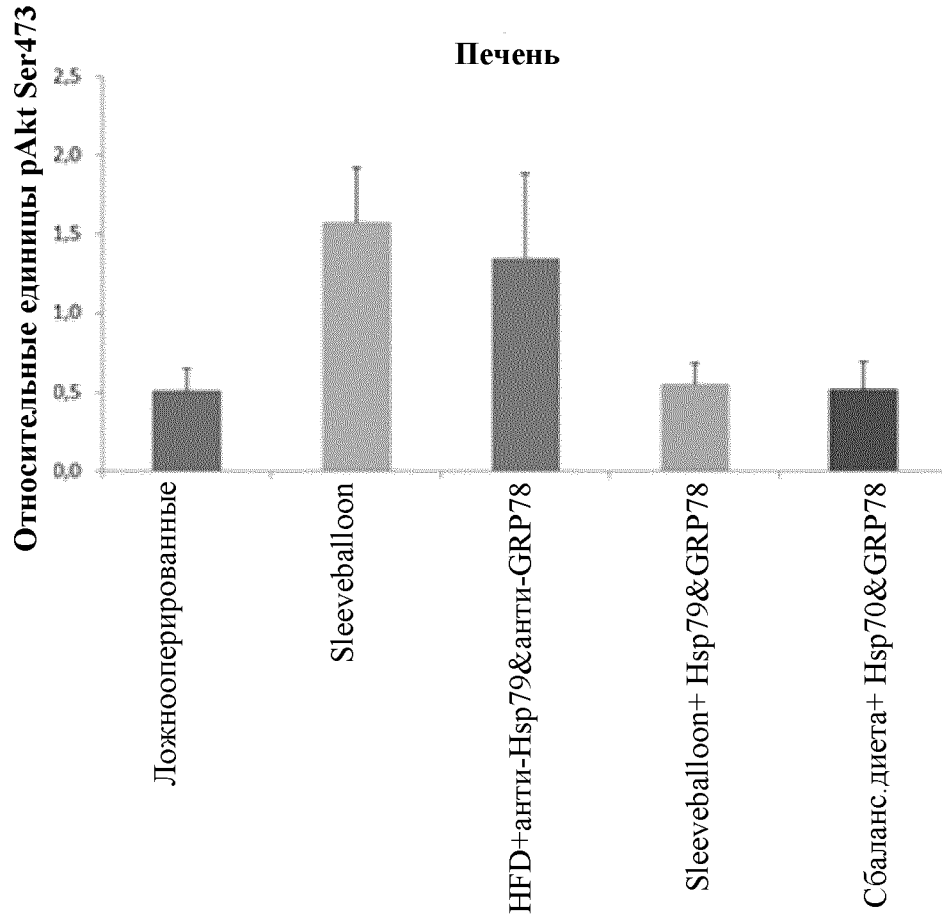


Фиг. 7

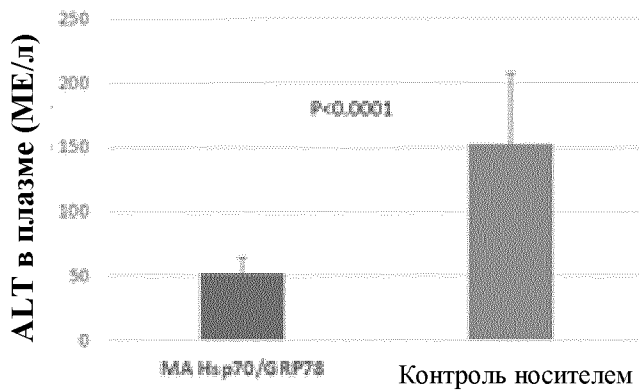


Фиг. 8

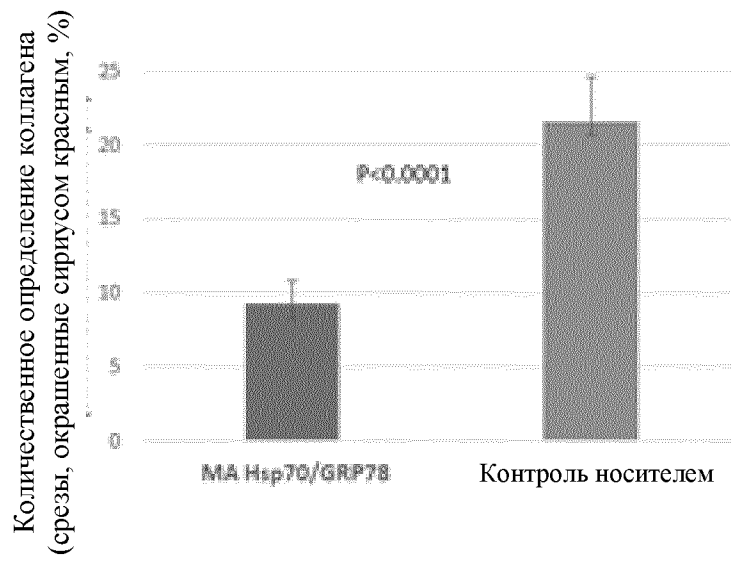




Фиг. 10

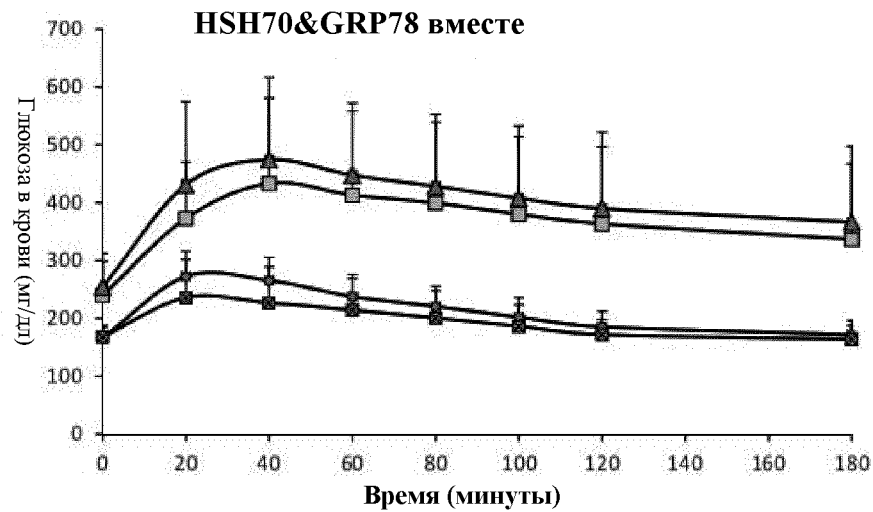


Фиг. 11



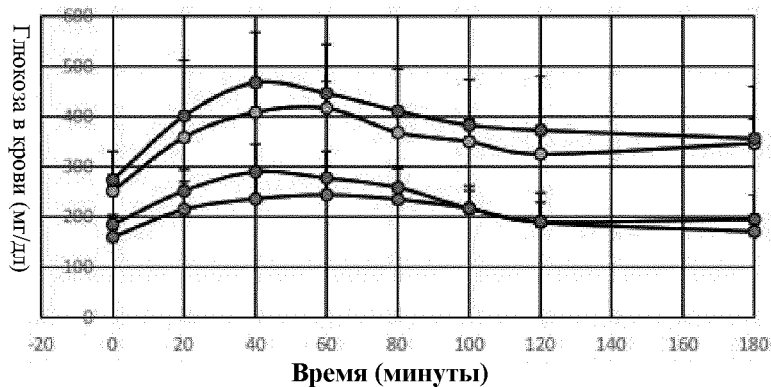
Фиг. 12

Sham – ложноперированные



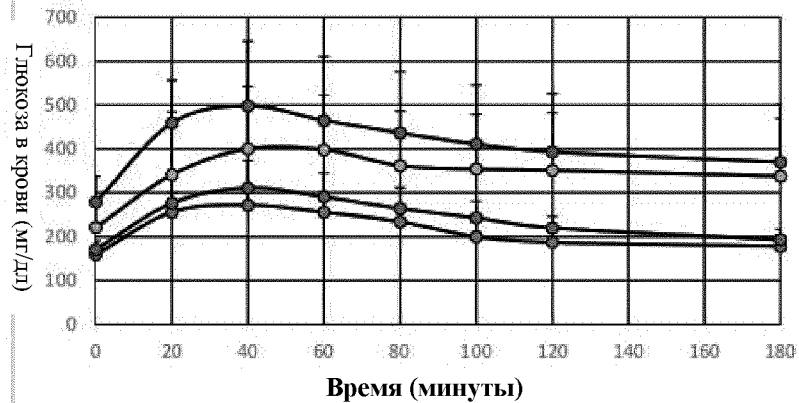
Sham  
 Sleeveballoon  
 Sleeveballoon +анти-HSH70&анти-GRP78  
 Sleeveballoon

Только HSP70



Sleeveballoon  
 Sleeveballoon + HSP70  
 Серия3  
 HFD+анти-HSH70

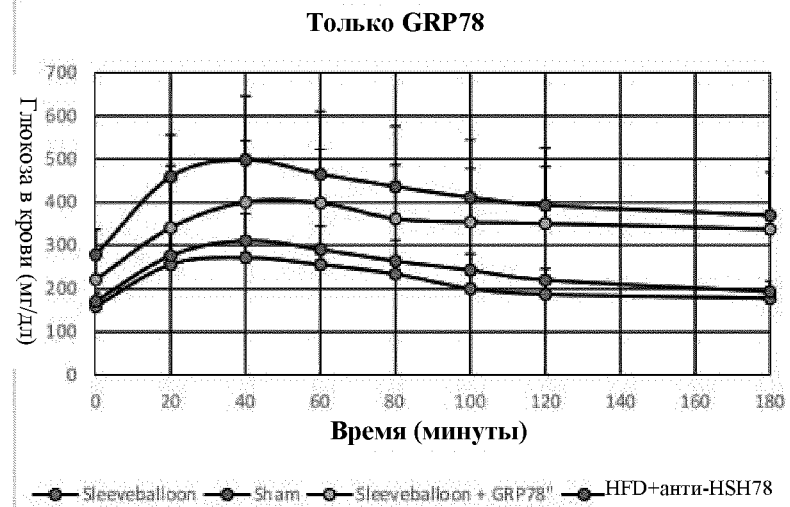
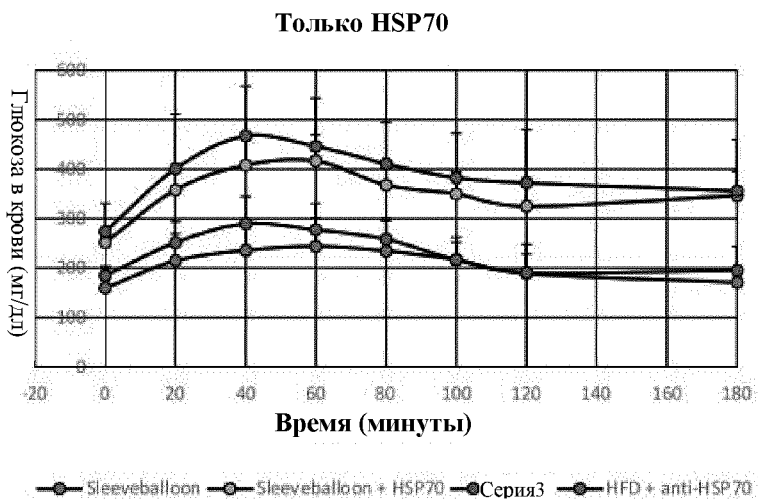
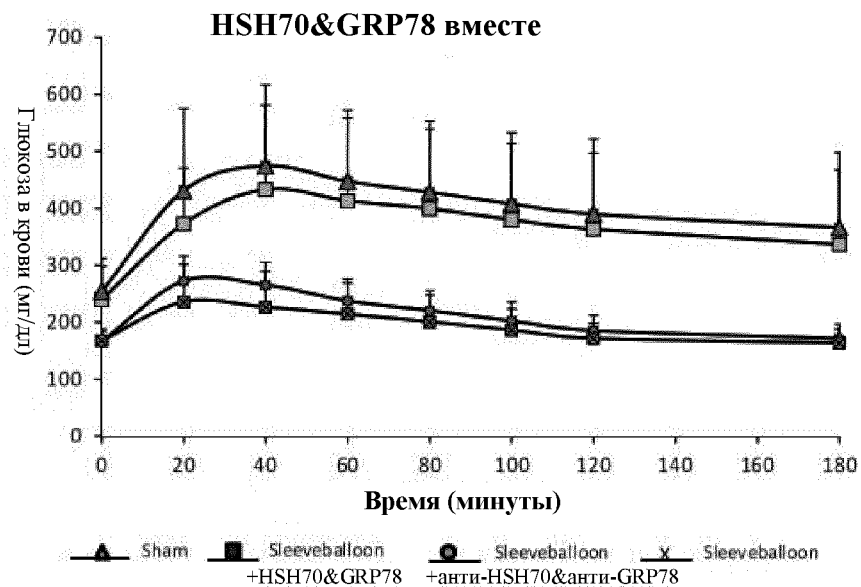
Только GRP78



Sleeveballoon  
 Sham  
 Sleeveballoon + GRP78  
 HFD+анти-HSH78

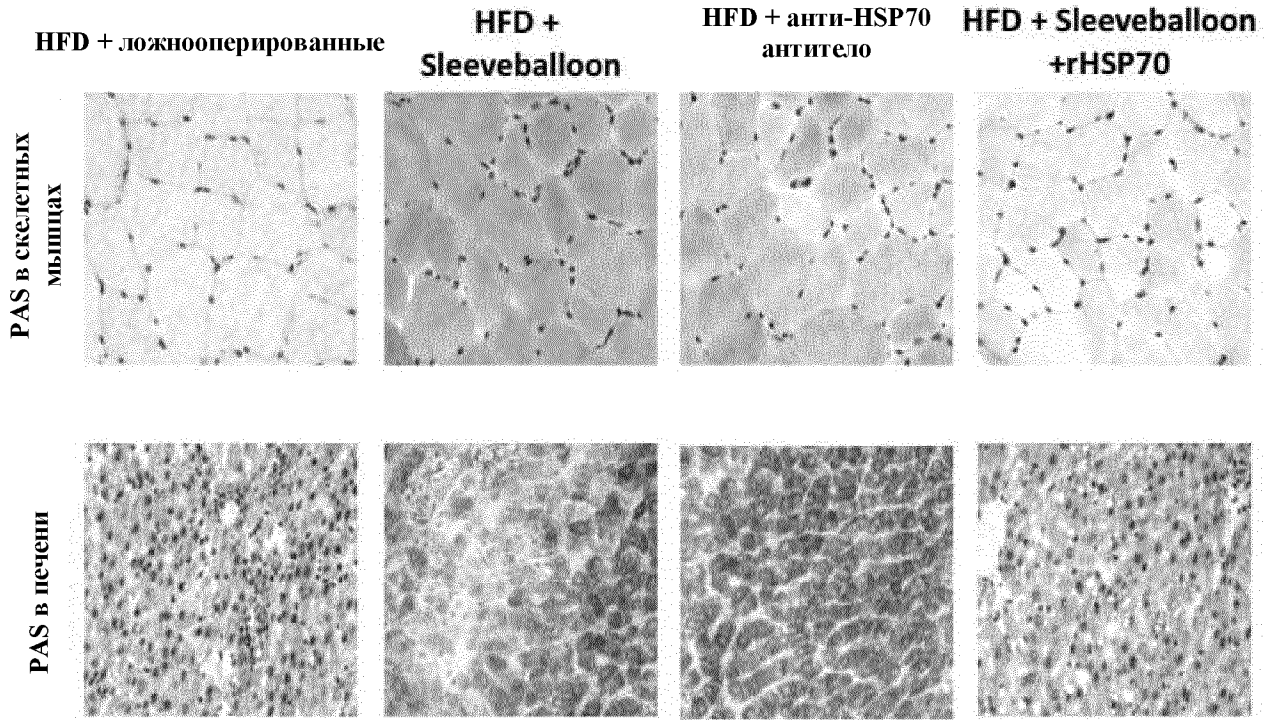
Фиг. 13

Sham – ложнопериванная

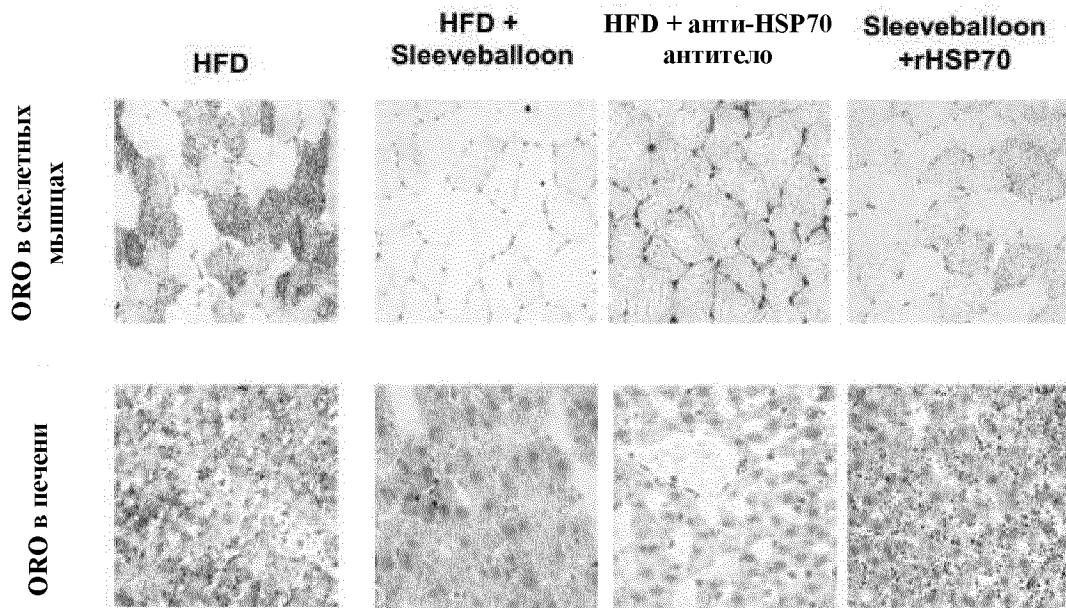


Фиг. 14

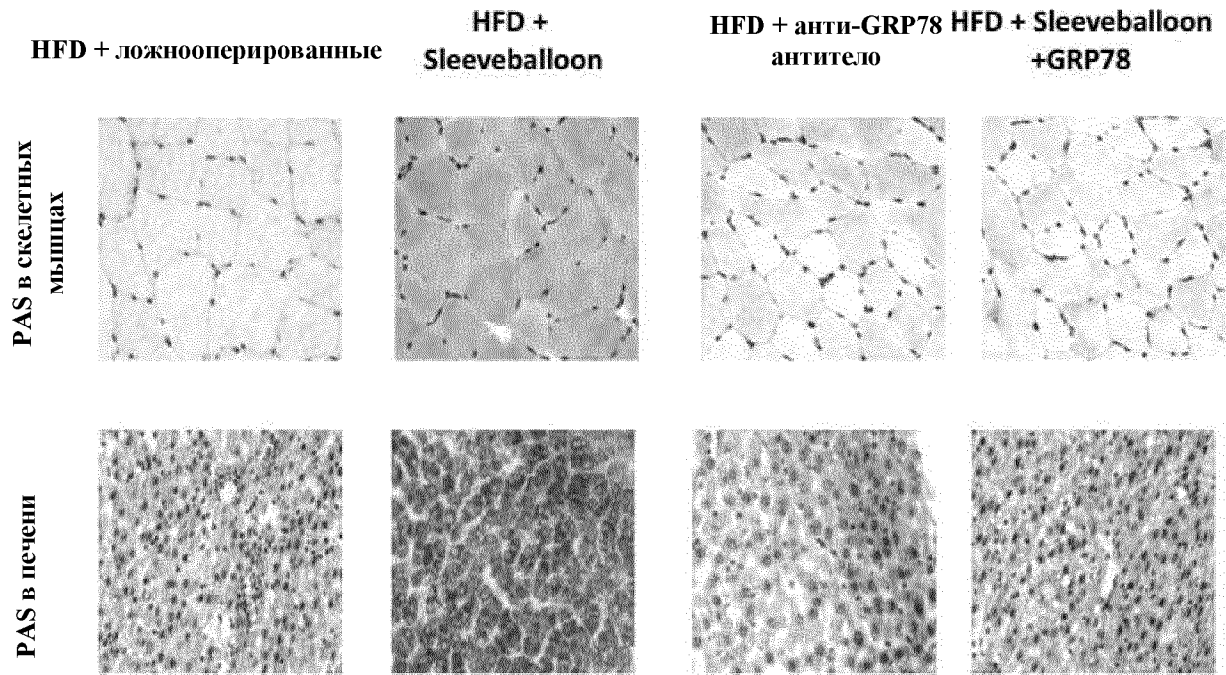




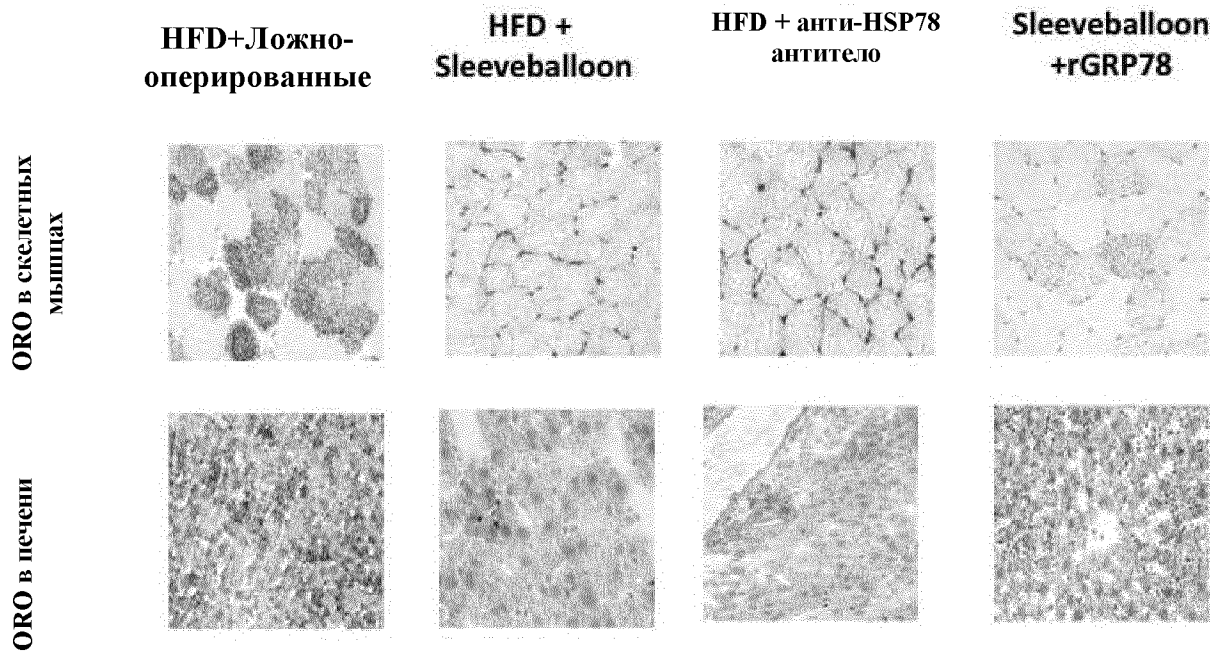
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

Фиг. 19

