

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040194**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.04.28**

(21) Номер заявки  
**201691498**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.01.29**

(51) Int. Cl. **A61K 38/03** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**A61P 3/08** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

---

(54) **НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ДИАБЕТА**

---

(31) **14153017.0**

(32) **2014.01.29**

(33) **EP**

(43) **2017.02.28**

(86) **PCT/EP2015/051856**

(87) **WO 2015/114062 2015.08.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНИВЕРСИТЕ ДЕ СТРАЗБУР;  
ЭНСТИТЮ НАСЪОНАЛЬ ДЕ  
ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ  
МЕДИКАЛЬ (FR); ВАКСИН ПТИ  
ЛТД (AU)**

(72) Изобретатель:  
**Марион Венсан (FR), Петровски  
Николай (AU)**

(74) Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

(56) **WO-A2-03034072  
WO-A2-2005079300  
WO-A2-2007146981  
WO-A2-2004028516  
COLLIN GAYLE B. ET AL.: "Mutations  
in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and  
neurosensory degeneration in Alstrom syndrome",  
NATURE GENETICS, NATURE PUBLISHING  
GROUP, NEW YORK, US, vol. 31, no. 1, 1 May 2002  
(2002-05-01), pages 74-78, XP002285133, ISSN:  
1061-4036 the whole document**

(57) Изобретение относится к идентификации ALMS1 как недостающего игрока, участвующего в регуляции инсулин-опосредованного поглощения глюкозы через GLUT4-сортировочные везикулы, и к отрицательной регуляции ALMS1 с помощью  $\alpha$ PKC. Соответственно, изобретение относится к молекуле, способной предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 для применения при лечении или профилактике сахарного диабета, в частности сахарного диабета 2 типа. Кроме того, изобретение относится к способу идентификации молекулы, способной предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1.

**B1**

**040194**

**040194**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, оно относится к диабету.

#### Предшествующий уровень техники

Сахарный диабет или диабет представляет собой группу метаболических заболеваний, при которых человек имеет высокий уровень сахара в крови, либо потому, что поджелудочная железа не вырабатывает достаточное количество инсулина, либо потому, что клетки не реагируют на вырабатываемый инсулин.

Существуют три основных типа диабета:

тип 1 приводит к неспособности организма вырабатывать инсулин и в настоящее время требует, чтобы индивидуум вводил инсулин или носил инсулиновый насос;

тип 2 является результатом резистентности к инсулину, состоянию, при котором клетки не используют инсулин должным образом;

третий называется гестационным диабетом и случается у беременных женщин.

Показатели сахарного диабета 2 типа заметно выросли с 1960 г. параллельно с ростом ожирения. По состоянию на 2010 г. насчитывалось около 285 млн людей с заболеванием по сравнению с около 30 млн в 1985 г. Долгосрочные осложнения от высокого уровня сахара в крови могут включать болезни сердца, инсульт, диабетическую ретинопатию, хроническую почечную недостаточность, которая может потребовать диализ, и плохое кровообращение в конечностях, приводящее к ампутациям. Может произойти некетоцическая гиперосмолярная кома.

Сообщалось, что гипергликемия принимает участие в возникновении и в прогрессирующем усилении сахарного диабета, т.е. имеется в виду теория токсичности глюкозы. А именно, хроническая гипергликемия ведет к уменьшению секреции инсулина и далее к снижению чувствительности к инсулину, а в результате, концентрация глюкозы в крови повышается таким образом, что сахарный диабет самообостряется. Поэтому при лечении гипергликемии цикл вышеупомянутого самообострения прерывается таким образом, что становятся возможными профилактика или лечение сахарного диабета.

К сожалению, существующим методам лечения не удается восстановить нормогликемию в долгосрочной перспективе, так как с течением времени снижается функция  $\beta$ -клеток. Кроме того, в настоящее время не существует ни одного препарата, который способен полностью изменить все аспекты этого заболевания.

Прогрессирующий характер сахарного диабета 2 типа означает, что многим пациентам в конечном итоге потребуется сочетание перорального гипогликемического препарата, возможно, вместе с инъекциями инсулина и/или экзенатида. Антидиабетические агенты были разработаны для того, чтобы противодействовать основным механизмам, вовлеченным в сахарный диабет 2 типа: устойчивости к инсулину (бигуаниды и тиазолидиндионы) и секреции инсулина (сульфонилмочевины, глиниды, ингибиторы дипептидилпептидазы-4, 1 агонисты рецептора глюкагонподобного пептида), агенты, которые задерживают поглощение глюкозы в желудочно-кишечном тракте или способствуют потере массы, и новые агенты, которые способствуют выведению глюкозы в почечных канальцах. Тем не менее, большинство из этих препаратов, как было показано, имеют пагубные побочные эффекты, такие как увеличение массы, периферические отеки или застойная сердечная недостаточность, и существует серьезная проблема с потерей эффективности этих агентов при долгосрочном применении. Таким образом, несмотря на растущее число терапевтических возможностей для контроля гликемии, существует потребность в альтернативных и улучшенных препаратах для лечения диабета и связанных с ним состояний.

#### Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения идентифицировали новую цель для лечения диабета, в частности сахарного диабета 2 типа. Их новаторской находкой является ALMS 1 (белок синдрома Алстрёма 1), который участвует в регуляции инсулином поглощения глюкозы зрелыми адипоцитами посредством его взаимодействий при связывании с ключевыми молекулами, участвующими в регуляции глюкозы. Вкратце, они показали, что когда инсулин связывается со своим рецептором, то около Alms1 образуется и активируется белковый комплекс (ALMSома), что приводит к активации  $H^+$ -насоса, транслокации рецептора GLUT4 и поглощению глюкозы адипоцитами. Они также показали, что в отсутствие Alms1, и в следствии этого предотвращении сборки ALMSомы, глюкоза не может транспортироваться в клетки из-за невозможности слияния GLUT4 с клеточной мембраной. Следовательно, они показали, что модуляция комплексообразования ALMS1 может быть использована для регулирования транспорта глюкозы и, таким образом, может быть использована для обхода резистентности к инсулину, и для лечения диабета 2 типа.

Более конкретно, авторы изобретения идентифицировали два белка, участвующих в регуляции транспорта глюкозы с помощью ALMS1, а именно TBC1D4 (4 представитель семейства с TBC1-доменом) и  $\alpha$ PKC (PKC $\alpha$  или протеинкиназа C  $\alpha$ -типа). Более конкретно, участки связывания этих двух регулирующих глюкозу белков с ALMS1 настолько близки, что одновременное связывание обоих белков не представляется возможным из-за стерических препятствий. TBC1D4, через его взаимодействие с белками (т.е. Rab10, Rab14 и т.д.) и ALMS1, регулирует транслокацию рецепторов GLUT4 к клеточной мем-

бране. С другой стороны,  $\alpha$ PKC при связывании с ALMS1 блокирует сайт связывания TBC1D4 и, тем самым, отрицательно регулирует транслокацию рецепторов GLUT4 к клеточной мембране, уменьшая клеточное поглощение глюкозы. Кроме того, они продемонстрировали, что нацеленное воздействие на взаимодействие ALMS1 и  $\alpha$ PKC достаточно для того, чтобы вызвать всасывание глюкозы адипоцитами, независимо от наличия INS. Соответственно, новые терапевтические стратегии, продемонстрированные в данном изобретении, заключаются в повышении клеточной абсорбции глюкозы и уменьшении гипергликемии путем блокирования связывания  $\alpha$ PKC с ALMS1. Наиболее предпочтительно связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 ингибируется таким образом, чтобы связывание TBC1D4 с ALMS1 не изменялось или даже усиливалось.

Соответственно, настоящее изобретение относится к молекуле, способной предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1, для применения при лечении или замедлении прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирении и гиперинсулинемии. Оно также относится к применению такой молекулы для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии. Оно также относится к способу лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии у объекта, нуждающегося в этом, при котором вводится терапевтически эффективное количество молекулы, способной предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1, тем самым увеличивая поглощение глюкозы, индуцированное инсулином. В предпочтительно воплощении молекула не препятствует связыванию TBC1D4 с ALMS1. Предпочтительно, если молекула выбрана из группы, состоящей из пептидов или полипептидов или пептидомиметиков, антител, фрагментов или их производных, аптамеров, шпигельмеров и химических соединений. Более предпочтительно, если молекула представляет собой пептид длиной менее чем из 50 аминокислот, предпочтительно менее чем из 20 аминокислот.

В первом предпочтительном воплощении молекула представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента ALMS1 (SEQ ID NO: 1). Предпочтительно, если молекула представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента ALMS1, в том числе один или несколько из остатков, которые, согласно прогнозам, опосредуют взаимодействие с  $\alpha$ PKC, в частности, один или несколько из остатков, выбранных из перечня, состоящего из E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 и E2884. В наиболее конкретном воплощении молекула представляет собой пептид, содержащий или состоящий из одной из следующих последовательностей:

LSDSDSHYGPQHLESIDD (SEQ ID NO: 5);

DSHQTEETL (SEQ ID NO: 6);

QQTLPESHLP (SEQ ID NO: 7);

QALLDSHLPE (SEQ ID NO: 8);

PADQMTDTP (SEQ ID NO: 9);

HIPEEAQKVS AV (SEQ ID NO: 10);

SCIFLEQ (SEQ ID NO: 11), и

их фрагмента, включающего 6 смежных аминокислот.

Во втором предпочтительном воплощении молекула представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента  $\alpha$ PKC (SEQ ID NO: 4). Предпочтительно, если молекула представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента  $\alpha$ PKC, в том числе один или несколько из остатков, которые, согласно прогнозам, опосредуют взаимодействие с ALMS1, в частности один или несколько из остатков, выбранных из перечня, состоящего из F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 и I667.

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации молекул, пригодных для применения при лечении или замедлении прогрессирования или отсрочке возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, в котором анализируют способность молекулы предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 и отбирают молекулы, способные предотвращать это связывание. Способ может дополнительно включать стадию, на которой тестируется способность выбранной молекулы мешать связыванию TBC1D4 с ALMS1 и на которой отбирают молекулы, которые не мешают этому связыванию. Предпочтительно, если связывание определяется в клеточной системе, респонсивной на инсулин. Необязательно, связывание определяется в присутствии и/или в отсутствие инсулина.

Еще одна терапевтическая стратегия, выявленная в данном изобретении, заключается в повышении

клеточного поглощения глюкозы путем усиления связывания TBC1D4 с ALMS1. Еще одна терапевтическая стратегия, выявленная в данном изобретении, заключается в повышении клеточного поглощения глюкозы путем положительной регуляции экспрессии ALMS1.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к молекуле, способной усиливать связывание TBC1D4 с ALMS1 или повышать экспрессию ALMS1 для применения при лечении или задержке прогрессирования или отсрочке возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения, гиперинсулинемии и, в частности, сахарного диабета 2 типа. Оно также относится к применению такой молекулы для получения лекарственного средства для лечения, или замедления прогрессирования, или отсрочке возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, в частности сахарного диабета 2 типа. Оно также относится к способу лечения, или замедления прогрессирования, или отсрочке возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, в частности сахарного диабета 2 типа, у объекта, нуждающегося в этом, в котором вводят терапевтически эффективное количество молекулы, способной усиливать связывание TBC1D4 с ALMS1 или повышать экспрессию ALMS1, тем самым увеличивая поглощение глюкозы, индуцированное инсулином. В предпочтительном воплощении молекула также ингибирует связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1.

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации молекулы, пригодной для применения при лечении диабета, в котором анализируют способность молекулы повышать экспрессию ALMS1 и выбирают молекулы, способные к положительной регуляции ALMS1. Оно также относится к способу идентификации молекулы, пригодной для применения при лечении диабета, в котором анализируют способность молекулы увеличивать связывание TBC1D4 с ALMS1 и отбирают молекулы, способные увеличивать этот параметр связывания. Необязательно, способ дополнительно включает определение способности молекулы, предотвратить связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1, анализируют и отбор молекул, способных предотвращать это связывание.

#### **Подробное описание изобретения**

Авторы изобретения идентифицировали ALMS1 как недостающего ключевого игрока, участвующего в регуляции инсулин-опосредованного поглощения глюкозы посредством GLUT4-сортировочных везикул в адипоцитах.

В настоящее время признано, что даже если жировая ткань ответственна за около 20% абсорбции глюкозы, дисфункция в этой ткани может привести к возникновению диабета. Таким образом, любые средства, способные регулировать инсулин-опосредованное поглощение глюкозы в адипоцитах должны быть в состоянии задержать, обратить, или предотвратить возникновение сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии.

Активность ALMS1 отрицательно регулируется при связывании с  $\alpha$ PKC и активируется при связывании с TBC1D4. Также было показано, что участки связывания этих двух белков на ALMS1 настолько близки, что одновременное связывание обоих белков не допускается из-за стерических затруднений. Таким образом, этот механизм регулирования является новой мишенью для лечения или замедления прогрессирования или отсрочке возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, и изобретатели предлагают использовать молекулу, способную предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1, при этих терапевтических показаниях.

Определения.

ALMS1, белок синдрома Альстрёма 1, представляет собой белок, кодируемый геном ALMS1. Было обнаружено, что мутации в гене ALMS1 ответственны за синдром Альстрёма. Они описаны в нескольких базах данных, а именно UniProt ID No Q8TCU4; Gene ID No 7840, HGNG ID No 428. Эталонные последовательности представлены в Genbank под учетным номером NM\_015120.4 для мПНК и NP\_055935.4 для белка. Белковая последовательность человеческого ALMS1 описана в SEQ ID NO: 1.

TBC1D4 (4 представитель семейства TBC1-домена), также в настоящее время называемый As160, предполагается действует в качестве GTPаза-активирующего белка для RAB2A, RAB8A, RAB10 и RAB14. Он описан в нескольких базах данных, а именно UniProt ID No 060343, Gene ID No 9882, HGNG ID No 19165. Эталонные последовательности описаны в Genbank под NM\_014832.3 для мПНК и NP\_055647.2 для белка (для изоформы 1, выбранных в качестве канонических последовательностей). Изоформа 2, которая отличается от изоформы по отсутствующим аминокислотам в положениях 678-740, представлена в UniProt как No O60343-2, стимулирует транслокацию инсулин-индуцированного переносчика глюкозы SLC2A4/GLUT4 на плазматическую мембрану, тем самым увеличивая поглощение глюкозы. Белковая последовательность человеческого TBC1D4 (изоформа 1) представлена в SEQ ID NO: 2. Белковая последовательность человеческого TBC1D4 (изоформа 2) представлена в SEQ ID NO: 3.

Протеинкиназа С  $\alpha$ -типа, также называемая  $\alpha$ PKC, PKC-A или PKC- $\alpha$ , принадлежит к семейству серин- и треонинспецифических протеинкиназ, которые могут быть активированы с помощью кальция и вторичного мессенджера диацилглицерина. Она описана в нескольких базах данных, а именно UniProt ID No P17252, Gene ID No 9393, HGNG ID No 5578. Эталонные последовательности описаны в Genbank с NM\_02737.2 для мРНК и NP\_002728.1 для белка. Белковая последовательность человеческого  $\alpha$ PKC описана в SEQ ID NO: 4.

Методы скрининга.

Настоящее изобретение относится к *in vitro* или *ex vivo* способу идентификации, скрининга или отбора молекулы, способной предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1. Способ включает определение влияния молекул(ы) на связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 и отбор молекул(ы), если связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 уменьшается или предотвращается. Предпочтительно, если способ дополнительно включает определение влияния молекул(ы) на связывание TBC1D4 с ALMS1 и устранение молекул(ы), если связывание TBC1D4 с ALMS1 уменьшается или предотвращается. Необязательно, этот способ может включать стадию выбора молекул(ы), если связывание TBC1D4 с ALMS1 увеличивается или усиливается.

Настоящее изобретение также относится к *in vitro* или *ex vivo* способу идентификации, скрининга или отбора молекулы, способной усиливать или увеличивать связывания TBC1D4 с ALMS1. Способ включает определение влияния молекулы на связывание TBC1D4 с ALMS1 и выбор молекулы, если связывание TBC1D4 с ALMS1 увеличивается или усиливается. Необязательно, способ дополнительно включает определение влияния молекул(ы) на связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 и выбор молекул(ы), если связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 уменьшается или предотвращается.

Для того чтобы определить влияние молекулы на связывание  $\alpha$ PKC и/или TBC1D4 с ALMS1, может быть осуществлена любая технология, известная специалистам в данной области, в частности любой способ, пригодный для определения белковых взаимодействий. Например, рекомбинантный или очищенный нативный ALMS1 или  $\alpha$ PKC может быть связан с чипом для поверхностного плазмонного резонанса, а другая молекула может протекать над чипом для оценки аффинности связывания, например, в устройстве Biacore (General Electric, США). Такой же подход может быть использован для измерения аффинности связывания ALMS1 и TBC1D4 или ALMS1 и  $\alpha$ PKC.

Влияние молекул(ы) на связывание  $\alpha$ PKC и/или TBC1D4 с ALMS1 заключается в определении путем измерения связывания  $\alpha$ PKC и/или TBC1D4 с ALMS1 в отсутствие и в присутствии тестируемой молекулы и путем сравнения связывания  $\alpha$ PKC и/или TBC1D4 с ALMS1.

Кроме того, способ скрининга может включать предварительную стадию отбора молекул(ы), способных связываться с ALMS1. В самом деле, может быть выгодно, чтобы молекула, предотвращающая взаимодействия между ALMS1 и  $\alpha$ PKC, действовала непосредственно в месте связывания ALMS1 с  $\alpha$ PKC.

В качестве альтернативы способ скрининга может включать предварительную стадию отбора молекулы, способной связываться с  $\alpha$ PKC. В самом деле, также может быть выгодно, чтобы молекула, предотвращающая взаимодействия между ALMS1 и  $\alpha$ PKC, действовала непосредственно в месте связывания  $\alpha$ PKC с ALMS1.

Кроме того, способ скрининга может включать предварительную стадию отбора молекулы, способной связываться с TBC1D4.

В предпочтительном воплощении для идентификации, скрининга или отбора молекулы, способной предотвращать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1, способ скрининга по настоящему изобретению дополнительно включает определение влияния молекулы(л), в частности выбранной молекулы(л), на связывание TBC1D4 с ALMS1 и отбор молекулы(л), если связывание TBC1D4 с ALMS1 не уменьшается или не предотвращается молекулой(ами). Более того, способ может включать стадию выбора молекулы(л), если TBC1D4 с ALMS1 увеличивается или усиливается молекулой(ами).

В предпочтительном воплощении для идентификации, скрининга или отбора молекулы, способной повышать связывание TBC1D4 с ALMS1, способ скрининга по настоящему изобретению дополнительно включает определение влияния молекулы(л), в частности выбранной молекулы(л), на связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 и отбор молекулы(л), если связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1 уменьшается или предотвращается молекулой(ами).

Из-за большого размера партнеров по связыванию, в частности ALMS1 и TBC1D4, изобретатели предпочитают использовать клеточные системы для способов скрининга. Предпочтительно, если клеточная система связи является клеточной системой, реагирующей на инсулин. Например, клеточная система может быть выбрана из множества линий мезенхимальных клеток, мезенхимальных стволовых клеток, жировых мезенхимальных стволовых клеток, преадипоцитов и адипоцитов. Предпочтительно, если клетка представляет собой клетку человека.

Далее определения связывания можно проводить в присутствии или в отсутствие инсулина. Предпочтительно в присутствии инсулина для связывания  $\alpha$ PKC с ALMS1 и в присутствии инсулина для связывания TBC1D4 с ALMS1.

В первом аспекте может быть осуществлен анализ иммунопреципитации с использованием ALMS1 в качестве приманки, в частности, как подробно описано в экспериментальном разделе. Например, анализ может проводиться с клетками, в частности адипоцитами, культивируемыми в отсутствие и/или в присутствии инсулина, предпочтительно в отсутствие инсулина. Тестируемые молекулы добавляются в культуральную среду. Затем  $\alpha$ PKC подвергается иммунодетекции. Необязательно, TBC1D4 также может быть подвергнут иммунодетекции. Этот способ описан подробно в разделе "Примеры".

В предпочтительном воплощении количество  $\alpha$ PKC, связанное с ALMS1, определяется и по сравнению с количеством в отсутствие тестируемых молекул, в частности в отсутствие инсулина. Если количество  $\alpha$ PKC, связанной с ALMS1, уменьшается в присутствии тестируемой молекулы, то молекула отбирается.

Количество TBC1D4, связанного с ALMS1, определяется и сравнивается с количеством в отсутствие тестируемых молекул, в частности в присутствии инсулина или как в присутствии, так и в отсутствие инсулина. Если количество TBC1D4, связанного с ALMS1, уменьшается в присутствии тестируемой молекулы, то молекула отвергается. Если количество TBC1D4, связанного с ALMS1, возрастает в присутствии тестируемой молекулы, то молекула отбирается.

Во втором аспекте аффинная очистка в сочетании с масс-спектрометрией, может быть осуществлена, в частности, после химического перекрестного сшивания. Например, клетки могут быть выращены в среде, лишенной метионина и лейцина, но включающей фотоактивируемый метионин и лейцин. Затем клетки облучаются УФ для стабилизации белковых комплексов и белковые комплексы анализируются с помощью масс-спектрометрии.

Другие способы доступны специалисту в данной области, например, комплементация бимолекулярной флуоресценции, тандемная аффинная очистка и т.п. В частности, в WO 2012/117245 описан способ идентификации молекул, способных предотвращать взаимодействие между двумя белками: WO 2012/117245 (для идентификации малых молекул). В WO 12174489 также раскрыты способы разработки молекул, пригодных для предотвращения взаимодействия между двумя белками.

Кроме того, подходящие молекулы также могут быть спроектированы с помощью молекулярного моделирования. Такие способы, например, подробно описаны в разделе примеров.

В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к модели структурной гомологии ALMS1 и ее применению в качестве *in silico* способа для идентификации молекул, способных ингибировать или стимулировать функцию ALMSомы, в частности, для ингибирования взаимодействия между ALMS1 и  $\alpha$ PKC и/или для увеличения взаимодействия между ALMS1 и TBC1D4.

Оно также относится к модели структурной гомологии TBC1D4 и ее использования в способе *in silico* для идентификации молекул, способных ингибировать или стимулировать функцию ALMSомы, в частности увеличивать взаимодействие между ALMS1 и TBC1D4.

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации, скрининга или отбора молекулы, способной положительно регулировать ALMS1 на уровне генов и белков. Способ включает определение влияния молекулы(л) на экспрессию ALMS1 и отбор молекулы(л), если экспрессия ALMS1 увеличивается. Для того чтобы определить влияние молекулы на экспрессию ALMS1, может быть осуществлена любая технология, известная специалисту в данной области.

Различные методы, известные в данной области, могут быть использованы для обнаружения или количественного определения экспрессии ALMS1, включая секвенирование, гибридизацию, амплификацию и/или связывание со специфическими лигандами (например, антителами). Подходящие способы включают саузерн-блоттинг (для ДНК), блоттинг (для РНК), флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), миграцию в геле, ELISA, радиоиммунологические анализы (RIA) и иммуно-ферментативные анализы (IEMA).

"Увеличенный", "увеличение" или "усиление" предназначены для обозначения связывания, увеличенного по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению со связыванием, измеренным в отсутствие тестируемой молекулы в тех же самых условиях. "Сниженный" или "снижение" предназначены для обозначения к снижению связывания по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% по сравнению со связыванием, измеренным в отсутствие тестируемой молекулы в тех же условиях.

Кроме того, способы скрининга по настоящему изобретению могут включать анализ моделей на животных. Тестируемые молекулы могут быть введены в модели на животных и может быть оценено влияние молекул на поглощение глюкозы или диабета. Например, модели на животных могут быть мышами или крысами с резистентностью к инсулину, сахарным диабетом или гипергликемией. Влияние молекулы может быть оценено путем измерения уровня глюкозы в крови.

Молекулы.

Молекулы, способные предотвращать или блокировать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1, могут быть любыми лигандами, способными связывать либо  $\alpha$ PKC, либо ALMS1 и, таким образом, предотвращать или блокировать связывание  $\alpha$ PKC с ALMS1.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле, которая предотвращает или блоки-

рует связывание  $\alpha$ ПКС с ALMS1 путем взаимодействия с одним или несколькими из остатков ALMS1, выбранных из перечня, состоящего из E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 и E2884. В ином аспекте настоящее изобретение относится к молекуле, которая предотвращает или блокирует связывание  $\alpha$ ПКС с ALMS1 путем взаимодействия с одним или несколькими из остатков  $\alpha$ ПКС, выбранных из перечня, состоящего из F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 и I667.

Молекулами, способными усиливать или увеличивать связывание TBC1D4 с ALMS1, могут быть любые лиганды, способные связываться либо TBC1D4, либо ALMS1 и, тем самым, повышать или увеличивать связывание TBC1D4 с ALMS1.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле, которая усиливает или увеличивает связывание TBC1D4 с ALMS1 путем взаимодействия с одним или несколькими из остатков ALMS1, выбранных из перечня, состоящего из H65, L66 и S2879. В ином аспекте настоящее изобретение относится к молекуле, которая усиливает или увеличивает связывание TBC1D4 с ALMS1 путем взаимодействия с одним или несколькими из остатков TBC1D4, выбранных из перечня, состоящего из G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82 и I83.

Настоящее изобретение относится к таким молекулам, фармацевтической композиции, содержащей такие молекулы, и применению таких молекул в качестве лекарственного средства или для изготовления лекарственного средства.

Эти молекулы могут быть пептидами или полипептидами или миметиками пептидов, антителами, фрагментами или их производными, аптамерами, шпигельмерами или химическими соединениями. Эти молекулы могут быть выбраны с помощью способов скрининга, известных в данной области, или как описано выше, и могут быть спроектированы любым удобным *in silico* способом моделирования.

В предпочтительном воплощении молекула представляет собой пептид или полипептид. В предпочтительном воплощении пептид может иметь от 5 до 50 аминокислот. Более предпочтительно она имеет от 5 до 20 аминокислот. Более предпочтительно пептид или полипептид содержит менее чем 50 аминокислот, более предпочтительно менее чем 40, 30, 20, 15 или 10 аминокислот.

В первом аспекте молекула представляет собой пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента ALMS1 (SEQ ID NO: 1). В предпочтительном воплощении молекула представляет собой пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента ALMS1, в том числе один или несколько из остатков, которые, согласно прогнозам, опосредуют взаимодействие с  $\alpha$ ПКС. В частности, эти остатки выбирают из перечня, состоящего из E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 и E2884. Более предпочтительно, если эти остатки выбирают из перечня, состоящего из D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 и E2884. D58, S59, G62, H65 и L66 образуют первый сегмент взаимодействия. T737 и E738 определяют второй сегмент взаимодействия. D828 и S829 определяют третий сегмент взаимодействия. T1088 и D1089 определяют четвертый сегмент взаимодействия. A1169 и Q1170 определяют пятый сегмент взаимодействия. F2882, L2883 и E2884 определяют шестой сегмент взаимодействия.

В очень конкретном аспекте пептид или полипептид содержит или состоит из одной из следующих последовательностей:

LDSDSHYGPNHLESIDD (SEQ ID NO: 5), нацеленной на первый сегмент взаимодействия;

DSHQTEETL (SEQ ID NO: 6), нацеленной на второй сегмент взаимодействия;

QQTLPESHLP (SEQ ID NO: 7);

QALLDSHLPE (SEQ ID NO: 8), нацеленной на третий сегмент взаимодействия;

PADQMTDTP (SEQ ID NO: 9), ориентированной на четвертый сегмент взаимодействия;

HIPEEAQKVSVA (SEQ ID NO: 10), ориентированной на пятый сегмент взаимодействия;

SCIFLEQ (SEQ ID NO: 11), ориентированной на шестой сегмент взаимодействия,

их фрагмент, содержащий 6 смежных аминокислот.

Во втором аспекте молекула представляет собой пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента  $\alpha$ ПКС (SEQ ID NO: 4). В предпочтительном воплощении молекула представляет собой пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента  $\alpha$ ПКС, в том числе один или несколько из остатков, которые, согласно прогнозам, опосредуют взаимодействие с ALMS1. В частности, эти остатки выбраны из перечня, состоящего из F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 и I667. F114, D116, C118 и L121 могут определить первый сегмент взаимодействия. N138, Q142, I145 и P148 могут определить второй сегмент взаимодействия. E545, S562 и S566 могут определить третий сегмент взаимодействия. F597, D601, W602, K604 и E606 определяют четвертый сегмент взаимодействия. V664 и I667 могут определить пятый сегмент взаимодействия.

Необязательно, пептид или полипептид может включать один, два, три, четыре или пять аминокислотных замен по сравнению с эталонной последовательностью, т.е. последовательностью SEQ ID NO: 1

для пептидов, полученных из ALMS1, SEQ ID NO: 4 для пептидов, полученных из  $\alpha$ PKC, и SEQ ID NO: 2 или 3 для пептидов, полученных из TBC1D4.

Пептид или полипептид может дополнительно содержать часть, облегчающую его поглощение клеткой или вход в клетку, в частности PTD (домен белковой трансдукции). PTD обычно содержит определенную последовательность из 10-20 аминокислот (Matsushita and Matsui, (2005), J. Mol. Med. 83, 324-328; Vivès et al., Biochimic et Biophysica Acta, 2008, 1786, 126-138). PTD в основном состоит из основных аминокислот, таких как аргинин или лизин, и типичные примеры PTD включают аргинин-богатые пептиды, такие как полиR<sub>8</sub> (RRRRRRRR) или (RRPRRPRRPRRPRR), пептид антеннапедия или пенетратин, такой как (RQIKIWFQNRRMKWKK) или HIV-Tat (YGRKKRRQRRR).

В конкретном аспекте молекула представляет собой антитело, фрагмент или его производное.

Пептид или полипептид может содержать природные аминокислоты и/или неприродные аминокислоты. "Неприродные аминокислоты" предназначены для обозначения аналога или производного природной аминокислоты (т.е. Ala, Val, Gly, Leu, Ile, Lys, Arg, Glu, Gln, Asp, Asn, His, Tyr, Phe, Trp, Ser, Pro, Thr, Cys, Met). Они имеют модифицированную боковую цепь, например, более короткую, длинную или с другими функциональными группами. Рассматриваются изомеры D и L, в частности, потому, что изомеры D не чувствительны к действию протеаз. Кроме того, модификации некоторых или всех пептидных связей также рассматриваются для увеличения сопротивления протеолизу, в частности, с помощью (-CO-NH-) с помощью (-CH<sub>2</sub>-NH-), (-NH-CO-), (-CH<sub>2</sub>-O-), (-CH<sub>2</sub>-S-), (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), (-CO-CH<sub>2</sub>-), (-CHOH-CH<sub>2</sub>-), (-N=N-) и/или (-CH=CH-). Пептид может представлять карбоксильный C-конец (-COO<sup>-</sup>) и амидный конец (-CONH<sub>2</sub>). Пептид также может быть последовательностью D-ретро-инверсопептида, описанного в данном документе. N-конец может быть изменен, в частности, ацетильным радикалом. Необязательно, пептид или полипептид может быть пегилированным для повышения стабильности. В качестве альтернативы этот пептид может быть модифицирован для того, чтобы сделать из него сшитый пептид. Термин "сшитый пептид", используемый в данном описании, относится к искусственно модифицированному пептиду, в котором структура стабилизирована одним или несколькими искусственными молекулярными мостиками (перекрестные связи), которые соединяют прилегающие витки  $\alpha$ -спиралей в пептиде. Методики получения сшитых пептидов были широко рассмотрены, например, в Verdine & Hilinski (2012, Methods Enzymol, 503, 3-33), WO 10033617 и WO 10011313, описание которых включено в данный документ в виде ссылки).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей пептид, определенный выше, и фармацевтически приемлемый носитель/эксципиент. Оно также относится к пептиду, определенному выше, для применения в качестве лекарственного средства или к применению пептида, определенному выше, для изготовления лекарственного средства.

В ином воплощении молекула представляет собой антитело, его фрагмент или его производное. Используемый в данном описании термин "антитело" и "иммуноглобулин" имеют одинаковое значение и используются одинаково в настоящем изобретении. Термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, т.е. молекулам, которые содержат антиген-связывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с антигеном. Антитела включают любые антитела, предпочтительно моноклональные. Они могут быть, например, IgG (иммуноглобулин G) или V<sub>H</sub>N (вариабельный домен тяжелой цепи антитела из верблюдовых). Антитела, их фрагменты или производные включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, ScFv, (ScFv)<sub>2</sub>, Dab, фрагменты гипервариабельных участков (CDR), линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, минитела, димеры и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Антитела, фрагменты или производные могут блокировать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ PKC. Предпочтительно, если они не оказывают никакого влияния на взаимодействие между ALMS1 и TBC1D4 или оказывают влияние, усиливающее взаимодействие.

В первом воплощении изобретения антитело является специфическим к ALMS1. В частности, эпитоп антитела содержит один или несколько из остатков ALMS1, вовлеченных во взаимодействие с  $\alpha$ PKC, в частности один или несколько остатков, выбранных из перечня, состоящего из E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 и E2884.

В ином случае антитело является специфическим для  $\alpha$ PKC. В частности, эпитоп антитела содержит один или несколько из числа остатков  $\alpha$ PKC, участвующих во взаимодействии с ALMS1, в частности один или несколько остатков, выбранных из перечня, состоящего из F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 и I667.

Такие антитела могут быть получены иммунизацией млекопитающих, не являющихся человеком, иммуногенными пептидами или белками, содержащими один или несколько остатков, определенных в качестве участвующих во взаимодействии между ALMS1 и  $\alpha$ PKC. В качестве альтернативы может быть получена и подвергнута скринингу библиотека антител. Полученные антитела, фрагменты или производные затем подвергают скринингу на предмет их способности связывать один из взаимодействующих партнеров и/или их способности предотвращать, ингибировать или блокировать взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ PKC. Кроме того, как ранее указано, антитела, фрагменты или производные могут быть до-

полнительно подвергнуты скринингу на их способность модулировать взаимодействие между TBC1D4 и ALMS1 и отобраны, если они увеличивают или усиливают взаимодействие.

Антитела, фрагменты или производные могут усилить взаимодействие между ALMS1 и TBC1D4. Предпочтительно они оказывают блокирующее влияние на взаимодействие между ALMS1 и  $\alpha$ PKC.

В первом воплощении изобретения антитело является специфическим к ALMS1. В частности, эпитоп антитела включает один или несколько из остатков ALMS1, участвующих во взаимодействии с TBC1D4, в частности один или несколько остатков, выбранных из перечня, состоящего из H65, L66 и S2879.

В ином случае антитело является специфическим к TBC1D4. В частности, эпитоп антитела содержит один или несколько из остатков TBC1D4, вовлеченных во взаимодействие с ALMS1, в частности один или несколько остатков, выбранных из перечня, состоящего из G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82 и I83.

Такие антитела могут быть получены иммунизацией млекопитающих, отличных от человека, иммуногенными пептидами или белками, содержащими один или несколько остатков, определенных в качестве участвующих во взаимодействии между ALMS1 и TBC1D4. В качестве альтернативы может быть представлена и подвергнута скринингу библиотека антител. Полученные антитела, фрагменты или производные затем подвергают скринингу на предмет их способности связывать один из взаимодействующих партнеров и/или их способности усиливать или увеличивать взаимодействие между ALMS1 и TBC1D4. Кроме того, как ранее указано, антитела, фрагменты или производные могут быть дополнительно подвергнуты скринингу на их способность модулировать взаимодействие между  $\alpha$ PKC и ALMS1 и отобраны, если они уменьшают или блокируют взаимодействие.

Получение моноклональных или поликлональных антител хорошо известно в данной области, и любые из множества доступных методов могут быть использованы (см., например, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). Методы получения одноцепочечных антител (патент США № 4946778), могут быть адаптированы для получения антител к искомым полипептидам. Кроме того, трансгенные мыши или другие организмы, такие как другие млекопитающие, могут быть использованы для экспрессии гуманизированных, химерных или аналогичным образом модифицированных антител. В качестве альтернативы может быть использована технология фагового дисплея для идентификации антител и гетеромерных фрагментов Fab, специфически связывающихся с выбранными антигенами (см., например, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992)).

Для аптамеров и шпигельмеров подобные способы могут быть использованы для отбора аптамеров и шпигельмеров. Эти способы хорошо известны специалистам в данной области.

Используемый в данном документе термин "аптамеры" означает молекулу нуклеиновой кислоты или пептид, способные связывать ALMS1,  $\alpha$ PKC или TBC1D4. Она относится к классу молекул, который представляет собой альтернативу антител в области молекулярного распознавания. Аптамеры являются олигонуклеотидными или олигопептидными последовательностями, обладающими способностью распознавать практически любой класс молекул-мишеней с высоким сродством и специфичностью.

Такие лиганды могут быть выделены с помощью систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) из библиотеки случайных последовательностей, как описано в Tuerk C. and Gold L., *Science*, 1990, 249(4968): 505-10. Библиотека случайных последовательностей может быть получена путем комбинаторного химического синтеза ДНК. В этой библиотеке каждый элемент представляет собой линейный олигомер, в конечном счете, химически модифицированный, с уникальной последовательностью. Возможные модификации, применения и преимущества этого класса молекул были рассмотрены в Jayasena S.D., *Clin. Chem.*, 1999, 45(9): 1628-50.

Пептидные аптамеры состоят из варибельной области антитела с зафиксированной конформацией, экспонируемой белковой платформой, такой как тиоредоксин A *E.coli*, которые выбраны из комбинаторных библиотек, дигибридными способами (Colas et al., *Nature*, 1996, 380, 548-50).

Шпигельмеры были описаны, например, в публикации WO 98/08856. Они представляют собой молекулы, подобные аптамерам. Однако шпигельмеры состоят полностью или в основном из L-нуклеотидов, а не D-нуклеотидов в отличие от аптамеров. В других отношениях, в частности в отношении возможных длин шпигельмеров, к шпигельмерам относится то же, что и описанное для аптамеров.

Химические соединения относятся к молекулам менее чем около 1500 Да, 1000 Да, 800 Да или даже менее чем около 500 Да, в частности к органическим или неорганическим соединениям. Структурный дизайн в области химии должен помочь найти такую молекулу. Молекула может быть идентифицирована с помощью способа скрининга, описанного в настоящем изобретении.

Синтетические библиотеки соединений коммерчески доступны от ряда компаний, в том числе Maybridge Chemical Co. (Тревиллет, Корнуэлл, Великобритания), Comgenex (Принстон, Нью-Джерси), Brandon Associates (Мерримак, Нью-Гемпшир) и Microsource (Нью-Милфорд, Коннектикут). Комбинаторные библиотеки доступны или могут быть получены в соответствии с известными методами синтеза. В ином случае библиотеки природных соединений в виде экстрактов бактерий, грибов, растений и животных

можно приобрести, например, у Pan Laboratories (Ботелл, Вашингтон) и MycoSearch (Северная Каролина), можно либо легко получить способами, хорошо известными в данной области.

Кроме того, природные и синтетически произведенные библиотеки и соединения могут быть дополнительно модифицированы с помощью обычных химических и биохимических методов.

Молекула может быть ковалентно или нековалентно связана с группой, нацеленной на соответствующие ткани, предпочтительно на жировую ткань, или с группой, облегчающей проникновение молекулы в клетки.

Терапевтические показания.

Авторы предлагают использовать молекулы, описанные в данном документе, для увеличения поглощения глюкозы, в частности, адипоцитами, посредством чего будет осуществляться регуляция и контроль уровня глюкозы в крови. В этом случае молекулы пригодны для лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии.

Сахарный диабет характеризуется гипергликемией. Более конкретно, диабет 2 типа характеризуется гипергликемией и резистентностью к инсулину. Ожирение считается главной причиной диабета 2 типа у людей, которые генетически предрасположены к этому заболеванию. Диабетическая ретинопатия, диабетическая невропатия, диабетическая нефропатия - хорошо известные расстройства, связанные с диабетом и резистентностью к инсулину.

В этом случае уменьшением гликемии за счет увеличения потребления глюкозы можно лечить или замедлять прогресс или предотвращать возникновение этих заболеваний.

Настоящее изобретение относится также к молекулам по настоящему изобретению для применения для снижения дозы инсулина или прекращения приема инсулина, при использовании для лечения диабета у объекта, для применения молекул по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для снижения дозы инсулина или прекращения приема инсулина, при использовании для лечения диабета у объекта или к способу лечения диабета у объекта, в котором терапевтически эффективное количество молекулы по изобретению вводят объекту с пониженной дозой инсулина или в отсутствие приема инсулина. В более общем смысле его можно применять для снижения дозы антидиабетических препаратов.

"Лечить" или "лечение" подразумевают, что болезнь подвергается лечению, облегчению или замедлению. Это включает профилактическое или радикальное лечение. Термин лечение означает, в частности, коррекцию, задержку или восстановление нарушенного гомеостаза глюкозы. Термин "лечение" также означает улучшение усвоения глюкозы (например, захват глюкозы адипоцитами). В контексте настоящего изобретения термины "контроль за уровнем глюкозы в крови" или "контроль уровня глюкозы в крови" относятся к нормализации или регуляции уровня глюкозы в крови или плазме у объекта-млекопитающего, имеющего аномальные уровни (например, уровни которые находятся ниже или выше известного эталона, медианы или среднего значения для соответствующего объекта-млекопитающего с нормальным гомеостазом глюкозы).

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому или ветеринарному применению молекулы. Соответственно, объект может быть любым млекопитающим, предпочтительно человеком, например, взрослым или ребенком. В конкретном воплощении объектом является объект, страдающий от ожирения. Необязательно, объект не имеет выявляемых антиостровковых антител, и ультразвуковое исследование не выявляет у него панкреатических нарушений. В контексте ветеринарного применения объект может быть животным, предпочтительно млекопитающим, в частности домашним животным, например, собакой, кошкой или лошастью.

Молекулы в соответствии с изобретением могут быть использованы в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными препаратами, предпочтительно антидиабетическими лекарственными средствами, в частности, для лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей молекулу по настоящему изобретению, а также одно или несколько дополнительных активных лекарственных средств, предпочтительно антидиабетическое лекарственное средство.

Оно также относится к продукту или набору, содержащему молекулу по изобретению и одно или несколько дополнительных активных лекарственных средств, предпочтительно антидиабетических лекарственных средств, в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения или в виде комбинированного препарата, который содержит молекулу согласно настоящему изобретению и одно или несколько дополнительных активных лекарственных средств, предпочтительно антидиабетических препаратов, для одновременного, раздельного или последовательного применения, в частности, для лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропа-

тии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии.

Оно относится к молекуле по настоящему изобретению для применения при лечении или замедлении прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными лекарственными средствами, предпочтительно антидиабетическими лекарственными средствами.

Оно также относится к применению молекулы по изобретению и одного или нескольких дополнительных активных лекарственных средств, предпочтительно антидиабетических лекарственных средств, для получения лекарственного средства, в частности, для лечения или задержки прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии.

И, наконец, настоящее изобретение относится к способу лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, в котором терапевтически эффективное количество молекулы по настоящему изобретению вводят в комбинации с терапевтическим или субтерапевтическим эффективным количеством одного или нескольких дополнительных активных лекарственных средств, предпочтительно антидиабетических лекарственных средств. "Субтерапевтический" предназначен для обозначения количества, которое может составлять, например, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10% от обычной терапевтической дозы (в частности, для тех же показаний и для тех же путей введения).

В частности, дополнительное активное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, используемое для лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии. Например, дополнительное лекарственное средство может быть антидиабетическим лекарственным средством, таким как гипогликемическое средство или антигипергликемический агент. Оно может быть выбрано из неисчерпывающего перечня, включающего инсулин, метформин, сульфонилмочевины, такие как толбутамид, ацетогексамид, толазамид, хлорпропамид, глибенкламид (также называемый глибенкламид), глимепирид, глипизид, гликлазид, гликопирамид и глихидон, ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы, такие как акарбоза, миглитол и воглибоза, тиазолидиндионы, такие как пиоглитазон и розиглитазон, меглитинид, такой как репаглинид и натеглинид, инкретиновые миметики, аналоги и агонисты глюкагон-подобного пептида, такие как эксенатид, таспоглютид и лираглютид, ингибиторы дипептидилпептидазы-4, такие как вилдаглиптин, ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, аллоглиптин и септаглиптин, аналоги амилина, такие как памлинтид, ингибиторы SGLT2, такие как канаглифлозин и дапаглифлозин, или любой их комбинации.

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

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

Молекула, используемая в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, присутствует в терапевтически эффективном количестве. Термин "терапевтически эффективное количество", используемое в настоящей заявке, означает то количество терапевтического средства, вводимого пациенту, которого достаточно для лечения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения, гиперинсулинемии, как это определено выше.

Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу, формулируется в соответствии со стандартной фармацевтической практикой (Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York), известной специалисту в данной области.

Для перорального введения композиция может быть приготовлена в виде обычных пероральных лекарственных форм, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы и жидкие препараты, такие как сиропы, эликсиры и концентрированные капли. Могут быть использованы нетоксичные твердые носители или разбавители, которые включают, например, фармацевтические сорта маннита, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлозу, глюкозу, сахарозу, карбонат магния и т.п. Для прессованных таблеток связующие вещества, которые представляют собой агенты, придающие когезионные свойства порошковым материалам, также необходимы. Так, например, крахмал, желатин, сахара, такие как лактоза или декстроза, и природные или синтетические смолы могут быть использованы в качестве связующих веществ. Разрыхлители также необходимы в таблетках для облегчения разламывания таблет-

ки. Разрыхлители включают крахмалы, глины, целлюлозы, альгины, камеди и поперечно-сшитые полимеры. Кроме того, смазочные материалы и вещества, способствующие скольжению, также включают в таблетки для того, чтобы предотвратить прилипание таблеточного материала к поверхности в процессе производства и для улучшения характеристик текучести порошкового материала в процессе производства. Коллоидный диоксид кремния, наиболее часто используется в качестве вещества, способствующего скольжению, а соединения, такие как тальк или стеариновая кислота, наиболее часто используются в качестве смазочных материалов.

Для чрескожного введения композиция может быть приготовлена в виде мази, крема или гелевой формы, и соответствующие проникающие вещества или детергенты могут быть использованы для облегчения проникновения, например диметилсульфоксид, диметилацетамид и диметилформамид.

Для введения через слизистую могут быть использованы назальные спреи, ректальные или вагинальные суппозитории. Активное соединение может быть включено в любую из известных основ для суппозитория, способами, известными в данной области. Примеры таких основ включают масло какао, полиэтиленгликоль (карбовоски), полиэтилен сорбитан моностеарат, а также их смеси с другими совместимыми материалами для модификации температуры плавления или скорости растворения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены для высвобождения активного лекарственного средства, по существу, немедленно после введения или в любое заранее определенное время или период времени после введения.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать одну или несколько молекул по настоящему изобретению, связанных с фармацевтически приемлемыми наполнителями и/или носителями. Эти вспомогательные вещества и/или носители выбираются в соответствии с формой введения, как описано выше.

В конкретном воплощении фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит от 0,001 мг до 10 г молекулы по изобретению. В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит от 0,01 мг до 1 г молекулы по изобретению.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - метаболические характеристики мышей  $Alms^{foz/foz}$ . (A) Средняя масса тела самцов мышей дикого типа и  $Alms^{foz/foz}$  (n=6-8 мышей на генотип). (B) Фотография висцеральной жировой ткани у дикого типа и  $Alms^{foz/foz}$ . Масштабная метка: 25 мкм. (C) Тест на толерантность к инсулину (ИТТ) проводили на мышах дикого типа и  $Alms^{foz/foz}$  мышах, и соответствующая гистограмма демонстрирует площадь под кривой (AUC) для каждого генотипа (n=6-8 мышей на группу),  $p < 0,001$ . (D) Средняя масса тела самцов мышей дикого типа и  $Alms^{foz/foz}$  (n=6-8 мышей на генотип). (E) Фотография висцеральной жировой ткани из соответствующих мышей дикого типа и  $Alms^{foz/foz}$ . Масштабная метка: 25 мкм. (F) Тест на толерантность к инсулину выполняли на мышах дикого типа и  $Alms^{foz/foz}$  мышах, и соответствующая гистограмма демонстрирует AUC для каждого генотипа (n=6-8 мышей на группу). \*\*\* означает p-значение  $< 0,001$ . (G) Иммуноблоты для указанных белков в инсулинчувствительных тканях из нестрадающих ожирением мышей дикого типа и  $Alms^{foz/foz}$ . (H) Подсчет радиоактивных сигналов в различных целевых тканях после инъекции радиоактивной дезоксиглюкозы мышам дикого типа и мышам  $Alms^{foz/foz}$  (n=5 мышей на генотип). \* означает p-значение=0,05.

Фиг. 2 - сайленс-эффект ALMS1 в зрелых адипоцитах человека. (A) Фотографии, демонстрирующие отсутствие поглощения 2-NBDG (зеленый) в контрольных (shCTRL кшПНК) или лишенных ALMS1 адипоцитах (ALMS1 кшПНК) подвергнутых сайленсингу зрелых адипоцитов в отсутствие INS. (B) Фотографии, демонстрирующие отсутствие поглощения 2-NBDG в ALMS1 кшПНК по сравнению с CTRL кшПНК. Ядра окрашены с помощью DAPI, DIC: изображения дифференциального интерференционного контраста. (C) 3D-изображения CTRL кшПНК- или ALMS1кшПНК-зрелых адипоцитов, окрашенных по внутриклеточным триглицеридам (TG), плазматической мембране - красный (PM) и ядрам - синий (DAPI). (D) Измерения уровней флуоресценции, коррелирующих с количеством внутриклеточных Tg в зрелых адипоцитах (n=16 лунок на каждое измеренное условие), \* p-значение=0,05. (E-F) Иммунодетекция АКТ и pS473-АКТ в CTRL кшПНК- и ALMS1кшПНК-обработанных зрелых адипоцитах в присутствии и отсутствие INS. (G) 3D-изображения CTRL кшПНК- и ALMS1кшПНК-зрелых адипоцитов, демонстрирующие клеточную локализацию рецептора инсулина (IR-красный) и GLUT4 (зеленый) в отсутствие Ins. Изображения в сечении, отображающие динамику локализации GLUT4 в отсутствие Ins. (H) Через 30 мин стимуляции INS. (I) и с 30 мин стимуляцией INS, с последующим 2-часовым отсутствием INS. (J) в CTRL кшПНК- и ALMS1кшПНК-зрелых адипоцитах. Масштабная метка: 25 мкм в A, B, C и 5 мкм в GJ.

Фиг. 3 - прогнозируемые участки взаимодействия на белке ALMS1 и моделирование его партнера TBC1D4. (A) Спрогнозированная 3D-структура белка ALMS1 со спиралью и петлями. (B) Спрогнозированная 3D-структура белка ALMS1 с потенциальными участками взаимодействия, представленными красными точками. (C) Первичная последовательность белка TBC1D4 с указанной локализацией участков связывания или взаимодействующих доменов. (D) Спрогнозированная 3D-структура белка TBC1D4.

Фиг. 4 - ALMS1 требуется для клеточной направленной миграции TBC1D4. (A) In silico спрогнозированная 3D-структура, показывающая пространственное взаимодействие между ALMS1 и TBC1D4 с увеличенным видом участка взаимодействия, в котором выделены спрогнозированные взаимодействующие

щие аминокислотные остатки (L66, Y61 и S2879) белка ALMS1. (B) 3D-изображение иммуноокрашенных зрелых адипоцитов, отображающее колокализацию TBC1D4 (зеленый) и ALMS1 (красный). Ядра докрашены с помощью DAPI (синий). (C-D) Иммуноблоты указанных белков на клеточных лизатах (50 мкг общего количества белка загружали на одну дорожку) для CTRL кшПНК- и ALMS1кшПНК-зрелых адипоцитов, обработанных или не обработанных инсулином. 3D-изображения иммунофлюоресцентных экспериментов, выполненных либо на CTRL кшПНК-, либо на ALMS1кшПНК-, либо на TBC1D4кшПНК-зрелых адипоцитах, отображающие клеточную локализацию GLUT4 в отсутствие инсулина (-INS) (E) или в присутствии INS. (F). PM: плазматическая мембрана, ядра докрашены с помощью DAPI. 3D-изображения иммунофлюоресцентных экспериментов, выполненных либо на CTRL кшПНК-, либо на ALMS1кшПНК-адипоцитах, демонстрирующие клеточную локализацию GLUT4 (зеленый) и TBC1D4 в отсутствие INS (G) или через 30 мин после обработки INS. (H) Масштабные метки: 10 мкм.

Фиг. 5 - TBC1D4 не является единственным взаимодействующим партнером ALMS1, играющим роль в биологии адипоцитов. (A-C) Фотографии, демонстрирующие поглощение 2-NBDG в либо CTRL кшПНК-, либо ALMS1кшПНК-, либо TBC1D4кшПНК-депривированными адипоцитами после 30 мин стимуляции INS. (D-F) 3D-изображения, полученные с использованием непермеабелизованных зрелых адипоцитов, стимулированных INS, с последующей иммунодетекцией мембраносвязанного GLUT4 (зеленый). Плазматическая мембрана (PM) была окрашена с помощью Image-iT (красный), а ядра были докрашены с помощью DAPI. (G) Иммуноблоты 2 субъединиц протонного насоса (ATP6V0D1 и ATP6V1A), идентифицированных с помощью масс-спектрометрии в IP-экспериментах с использованием ALMS1 в качестве приманки (фиг. S4),  $\alpha$ PKC, GLUT4 и  $\beta$ -тубулин в клеточных экстрактах из белой жировой ткани (WAT) и почек, 50 мкг общего белка загружено на одну дорожку. (H) Фотография положительного сигнала Duolink, обнаруженного в адипоцитах с использованием антител против ALMS1 и ATP6. (I) Иммунофлуоресцентные изображения, демонстрирующие клеточные локализации ATP6V0D1 и ALMS1 и объединенное изображение в зрелых адипоцитах при стимуляции INS. (J) In silico спрогнозированные участки связывания TBC1D4 (красный) и PKC (желтый), которые находятся всего в 20 Å друг от друга в 3D-структуре ALMS1. (K-L) Иммунодетекция  $\alpha$ PKC, TBC1D4 и  $\alpha$ -актина в иммунопреципитатах с использованием ALMS1 в качестве приманки в адипоцитах, культивируемых в отсутствие или в присутствии INS.

Фиг. 6 - восстановление ацидификации в ALMS1-депривированных адипоцитах восстанавливает всасывание глюкозы. (A-B) Изображения серийной съемки с интервалом были выполнены либо на контрольных, либо на ALMS1-депривированных адипоцитах, окрашенных акридиновым оранжевым и стимулированных INS. (C-D) Изображения серийной съемки с интервалом были выполнены либо на контрольных, либо на ALMS1-депривированных адипоцитах, окрашенных акридиновым оранжевым и стимулированных электронейтральным ионофором-обменником  $K^+/H^+$ , нигерицином (NIG). (E) Сверху вниз: изображения контрольных адипоцитов, полученные сканирующей электронной микроскопией (SEM), стимулированных либо без INS, либо с INS, либо с NIG. Белые стрелки показывают разбухшие везикулы. (F) Изображения, полученные просвечивающей электронной микроскопией (TEM), соответствующие представленным в (E), демонстрируют слияние везикул с плазматической мембраной в присутствии INS и NIG. (G) Сверху вниз: SEM фотографии ALMS1-депривированных адипоцитов, стимулированных либо без INS, либо с INS, либо с NIG. (H) Изображения TEM, соответствующие представленным в (G), демонстрирующие слияние везикул с плазматической мембраной только в присутствии NIG. (I) Фотографии, демонстрирующие внутриклеточное содержание 2-NBDG (зеленый) в контрольных зрелых адипоцитах либо в отсутствие INS (верхняя панель), либо после 30 мин стимуляции INS (средняя панель), либо после 30 мин стимуляции NIG (нижняя панель). (J) Фотографии, демонстрирующие внутриклеточное содержание 2-NBDG (зеленый) в ALMS1-депривированных зрелых адипоцитах либо в отсутствие INS (верхняя панель), либо после 30 мин стимуляции INS (средняя панель), либо после 30 мин стимуляции NIG (нижняя панель). Масштабная метка: 20 мкм за исключением F и H: 500 нм.

Фиг. 7 - направленная миграция GLUT4 требует белковый комплекс ALMSомы. (A) 3D-изображения, полученные с использованием непермеабелизованных фиксированных зрелых адипоцитов, стимулированных NIG, с последующей иммунодетекцией мембраносвязанного GLUT4 (зеленый). Плазматическая мембрана (PM) была окрашена Image-It (красный), а ядра были докрашены с помощью DAPI. (B) Фотографии, демонстрирующие содержание внутриклеточных TG через 24 ч после обработки NIG. (C) Схематическое представление клеточной локализации ALMS1 и белка-партнера в отсутствие стимуляции INS в зрелом адипоците. (D) Схематическое представление динамики ALMS1 и белковых партнеров после стимуляции INS в зрелом адипоците.

Фиг. 8 - поглощение глюкозы инициируется в отсутствие INS посредством специфической интерференции с участком связывания  $\alpha$ PKC в ALMSоме. (A) Фотографии, демонстрирующие поглощение 2-NBDG в присутствии или в отсутствие INS в адипоцитах, инфицированных либо лентивирусными частицами CTRL, либо лентивирусными частицами с доменом  $\alpha$ PKC. (B) Количественное определение внутриклеточного аналога глюкозы 2-NB в присутствии либо лентивирусных частиц CTRL, либо лентивирусных частиц с доменом  $\alpha$ PKC (n=8 на группу).

Фиг. 9 - описание конструкции min- $\alpha$ PKC-FLAG в адипоцитах. Верхняя панель: иммунодетекция min- $\alpha$ PKC-FLAG с использованием анти-FLAG антитела в зрелых адипоцитах через 48 ч после инфекции лентивирусом. 2 и 3 панели: 3D-изображение адипоцитов, демонстрирующее перинуклеарную локализацию min- $\alpha$ PKC-FLAG. Последняя панель: схематическое представление экспериментальных подходов, используемых для оценки влияния min- $\alpha$ PKC-FLAG на поглощение глюкозы.

#### Примеры

Синдром Альстрёма (ALMS) является редким аутосомно-рецессивным заболеванием, характеризующимся несколькими клиническими признаками, включающими ожирение и раннее возникновение диабета. Это происходит из-за мутации в гене, кодирующем 460 кДа белок ALMS1.

До сих пор была неизвестна функция гена ALMS1 и то, как он вызывает фенотип синдрома Альстрёма, исследования его функции тормозит чрезвычайно большой размер кодируемого белка и его низкие уровни экспрессии.

Синдром Альстрёма (ALMS) является редким моногенным синдромом детского ожирения, для которого существует только один причинный мутантный ген, идентифицированный к настоящему времени, ген ALMS1. ALMS классифицируется как представитель расстройств цилиопатии, которые включают синдром Барде-Бидля, группу синдромных расстройств, возникающих из-за мутаций в большом количестве различных белков, которые вместе играют важную роль в функции первичной реснички. Alms1 кодирует 461 кДа белок ALMS1, который первоначально был описан как имеющий чисто центриольную локализацию, хотя более поздние данные также предположили цитоплазматическую локализацию ALMS1.

ALMS клинически отождествлен с совокупным мультисистемным фенотипом, который как предполагается, отражает убиквитарную тканевую экспрессию ALMS1, близко имитируя многие из фенотипических особенностей BBS. Общие клинические признаки ALMS включают дегенерацию сетчатки, потерю слуха, детское ожирение, раннее начало сахарного диабета 2 типа (T2DM), дилатационную кардиомиопатию, почечную и печеночную дисфункцию, гипотиреоз, низкорослость, гиперлипидемию и органический фиброз. У детей с ALMS развивается ожирение в раннем детстве, что связано с ранним возникновением T2DM примерно в 16 лет, с гораздо более высокой общей распространенностью раннего возникновения T2DM при ALMS, чем наблюдаемые с другими синдромами детского ожирения, дающими похожий индекс массы тела (ИМТ), в том числе BBS. Причина этого склонности к T2DM у детей с ALMS, которая не пропорциональна их степени ожирения, остается неясной.

Авторы настоящего изобретения исследовали роль белка ALMS1 в адипогенном процессе дифференцировки и обнаружили, что уровни экспрессии белка ALMS1 растут в ходе адипогенеза. Супрессия ALMS1 в адипогенных дифференцирующихся мезенхимальных стволовых клетках ингибирует антиадипогенные каскады, но на удивление не в пользу адипогенеза.

Кроме того, авторы показали, что белковый комплекс ALMS1 также необходим в зрелых адипоцитах для эффективного удержания GLUT4 в его инсулин-респонсивном компартменте и для его способности сливаться с плазматической мембраной в ответ на стимуляцию инсулином. Инактивация ALMS1 уменьшает количество глюкозы, которое способны поглотить зрелые адипоциты при стимуляции инсулином, способствуя таким образом гипергликемии и возникновению диабета.

Предыдущие исследования на спонтанном мутанте Alms1<sup>foz/foz</sup> и нокаутной по Alms1 мышшиной модели ALMS, полученной введением вставки внутрь гена, подтвердили, что у этих мышей, подобно страдающим от болезни детям, развивается ожирение в раннем подростковом возрасте из-за гиперфагии, а также проявляют нарушенную толерантность к глюкозе, гиперинсулинемию и островковую гипертрофию, что соответствует тяжелой резистентности к инсулину, хотя происхождение ткани или механизм для этой резистентности к инсулину ранее не были охарактеризованы. Ранее опубликованные *in vitro* исследования на мышшиной фибробластной линии клеток 3T3-L1 показали, что ингибирование экспрессии гена ALMS1 приводит к умеренному нарушению адипогенеза, но сообщалось, что не оказывается никакого влияния на инсулиновый сигнальный путь в полученных зрелых адипоцитах, что было измерено по инсулин-опосредованному фосфорилированию АКТ. Эти данные уводят в сторону от изобретения, представленного в данном документе, в котором Alms1 действительно играет критическую, неизвестную до настоящего времени роль в сигнальном пути инсулина и в GLUT4-опосредованном транспорте глюкозы.

Действительно, несмотря на ранее опубликованные противоречащие данные, авторы при тщательном изучении фенотипа мышшиной модели ALMS Fat Aussie (Alms1<sup>foz/foz</sup>) определили, что резистентность к инсулину в этой модели предшествует, а не следует за развитием ожирения. Кроме того, они идентифицировали жировую ткань как конкретный участок, управляющий резистентностью к инсулину, и последующим развитием толерантности к глюкозе и T2DM при ALMS. Они подтвердили, что сигнальный путь инсулина в адипоцитах Alms1<sup>foz/foz</sup> был интактным по всему пути вниз до фосфорилирования TBC1D4, последнего известного представителя пути инсулиноопосредованного поглощения глюкозы, и затем в ходе последующей серии исследований был определен белковый комплекс, который они назвали ALMSомой, состоящий из нескольких ключевых белков, которые связываются с ALMS1, и которые вместе необходимы для прикрепления и слияния GLUT4-везикул с плазматической мембраной (PM) адипо-

цитов в ответ на сигнал инсулина. ALMSoma, таким образом, представляет собой до сих пор неизвестную последнюю стадию инсулиноопосредованного поглощения глюкозы адипоцитами, с резистентностью к инсулину при ALMS из-за нарушения функции ALMSомы, ведущей к выходу из строя GLUT4-опосредованного слияния мембран и, таким образом, блокировке транспортировки глюкозы в адипоцитах.

Пример 1. Мыши  $Alms1^{foz/foz}$  демонстрируют сильную специфическую резистентность к инсулину в жировой ткани даже при отсутствии ожирения.

Содержание животных.

Мышей  $Alms1^{foz/foz}$  и однопометников  $Alms1^{+/+}$  (дикий тип) поддерживали в окружении C57BL/6J в виварии с 12-часовым циклом свет/темнота. Мыши имели свободный доступ ad libitum к воде и либо к нормальному корму, содержащему 5,4% жира, с содержанием энергии 12 МДж/кг (пеллеты Гордона для содержания мышей и крыс, Gordon's specialty stockfeeds, Австралия), либо к корму с высоким содержанием жиров (HFD), содержащему 23% жира, высоким уровнем простых углеводов, 0,19% холестерина, с содержанием энергии 20 МДж/кг (SF03-020, Specialty feeds, Австралия). Для ПЦР-генотипирования были использованы праймеры, фланкирующие мутацию *foz*: прямой ACA ACT TTT CAT GGC TCC AGT (SEQ ID NO: 13); обратный TTG GCT CAG AGA CAG TTG AAA (SEQ ID NO: 14).

Шестимесечных страдающих ожирением и молодых (в возрасте <60 дней) без ожирения  $Alms1^{foz/foz}$  мышей и однопометников дикого типа (WT) использовали для исследования первичных метаболических нарушений приводящих мышей  $Alms1^{foz/foz}$  к развитию T2DM. Шестимесечные  $Alms1^{foz/foz}$  мыши страдали от ожирения со средней массой тела  $45,5 \pm 1,7$  г по сравнению с  $26,4 \pm 1,3$  г для однопометников дикого типа (фиг. 1A) и, как было показано ранее, имели гипергликемию натощак и нарушенную толерантность к глюкозе с повышенными баллами HOMA. Тест на толерантность к инсулину (ИТТ) показал, что в отличие от WT (фиг. 1B) и гетерозиготных однопометников гликемия у страдающих ожирением  $Alms1^{foz/foz}$ -мышей была невосприимчива к введению инсулина (фиг. 1B), даже когда вводимые дозы инсулина достигали 20 Ед./кг (фиг. 1C). Ожирение  $Alms1^{foz/foz}$ -мышей возникло из-за сильной гипертрофии адипоцитов (фиг. 1B), а не гиперплазии адипоцитов, как правило, наблюдаемой у BBS-мышей с ожирением. Для того чтобы определить, какой первичный дефект вызывает нарушение толерантности к глюкозе у  $Alms1^{foz/foz}$  мышей, были изучены молодые худые  $Alms1^{foz/foz}$  мыши для того, чтобы удалить смешанное воздействие ожирения на респонсивность на инсулин. В возрасте 2 месяцев самцы WT и  $Alms1^{foz/foz}$  имели аналогичную среднюю массу тела ~24 г (фиг. 1D). ИТТ у этих мышей показало, что молодые без ожирения  $Alms1^{foz/foz}$  самцы тем не менее уже демонстрируют значительно уменьшенную респонсивность на инсулин (фиг. 1E) в соответствии с резистентностью к инсулину, предшествующей ожирению в этой модели. Иммунодетекция IRAP, Akt, p-AKT, GLUT4, C/EBP- $\alpha$  и GAPDH осуществленная на инсулин-чувствительных тканях, а именно сердце, печени, скелетных мышцах и белой жировой ткани (WAT), из 6-месячных не голодавших  $Alms1^{foz/foz}$  и WT не показали никаких существенных различий в уровнях белка, за исключением последовательного увеличения p-AKT относительно общего AKT в WAT, что согласуется с парадоксальным увеличением, а не снижением активации восходящих участников сигнального пути инсулина у  $Alms1^{foz/foz}$  мышей с нетолерантностью к глюкозе (фиг. 1G). Для того чтобы определить, какие ткани по отдельности или вместе могут быть основным источником резистентности к инсулину, наблюдаемой у мышей  $Alms1^{foz/foz}$ , распределение по тканям поглощения инсулиноопосредованной дезоксиглюкозы (DOG) сравнивали у WT и  $Alms1^{foz/foz}$  мышей. Это подтверждает, что серьезно ослабленное поглощение DOG было ограничено WAT из мышей  $Alms1^{foz/foz}$  с компенсаторным увеличением поглощения DOG в инсулинреспонсивных икроножной и камбаловидной мышцах по сравнению с мышами дикого типа.

Эти исследования показывают, что хотя  $Alms1^{foz/foz}$  мыши становятся тучными и у них развивается с возрастом прогрессирующий T2DM, основным изначальным дефектом, способствующим резистентности к инсулину и гипергликемии, является нарушение в отсутствие функционального ALMS1 поглощения глюкозы жировой тканью в ответ на передачу сигналов инсулина, и этот дефект предшествует развитию ожирения.

Пример 2. Сайленсинг  $Alms1$  в адипоцитах человека блокирует поглощение глюкозы из-за нарушения клеточной сортировки GLUT4.

Материалы. От Molecular Probes, Invitrogen: акридиновый оранжевый, набор для окрашивания плазматических мембран и ядер "Image-iT® LIVE Plasma Membrane and Nuclear Staining Labeling Kit", 2-NBDG (2-(N-7-нитробенз-2-окса-1,3-тиадиазол-4-ил)амино)-2-дезоксиглюкоза), Hoechst 33258 и Cell Light™ Early Endosomes-RFP \* BacMam 2.0\*; Каталожный номер #: A3568, I34406, N13195, H3569 и C10587. От Lonza: реактив "AdipoRed™ Assay Reagent" (Catalog #: PT-7009). Lentivirusные частицы от Santa Cruz Biotechnology, Inc.: ALMS1 лентивирусные частицы кшПНК (h), лентивирусные частицы TBC1D4 кшПНК (h) и лентивирусные частицы-A с контрольными кшПНК; Каталожный номер #: SC-72345-V, SC-61654-V и SC-108080 соответственно. От Tocris Biosciences: натриевая соль нигерицина (Каталожный номер #: 4312).

Биохимические тесты. Мышей испытывали на устойчивость к инсулину с помощью теста на толе-

рантность к инсулину (ИТТ) и теста на толерантность к глюкозе (внутрибрюшинный IPGTT). Для ИТТ мышей не кормили в течение 4 ч, без доступа к продуктам питания, но со свободным доступом к воде. Мышей взвешивали и инсулин (Humulin R., Eli Lilly, США) вводили внутрибрюшинно по 0,75 ед./кг массы тела в 0,9%-ном солевом растворе для инъекций (Pfizer, США). Получали кровь из хвоста и определяли уровень глюкозы в плазме для каждой мыши с помощью глюкометра (Optium Xceed, Abbott, США) и полосок для тестирования глюкозы в крови (Optium point of care, Abbott, США) в момент 0, 15, 30 и 60 мин после инъекции инсулина. Для IPGTT мышей не кормили в течение 18 ч и вводили в 2 мг/г массы тела D-глюкозы (Analar, VWR, США) в 0,9%-ном солевом растворе для инъекций. Уровень глюкозы в плазме определяли для каждой мыши с помощью глюкометра с отбором проб через хвостовую вену в момент 0, 15, 30, 60 и 120 мин после инъекции глюкозы. Для измерения инсулина в плазме отбирали кровь у бодрствующих животных посредством кровозвличения из щеки. После сбора пробы крови держали на льду и центрифугировали при 17000 g, 10 мин при 4°C. Уровни инсулина анализировали с помощью коммерческого ультрачувствительного к мышинному инсулину набора для ELISA (Crystal Chem Inc., США). Гомеостатическую модель оценки резистентности к инсулину (НОМА-IR) рассчитывали с использованием уровня инсулина натощак и глюкозы натощак у индивидуальной мыши. Использовалась следующая формула:  $\text{НОМА-IR} = [\text{глюкоза натощак (мг/дл)} \times \text{инсулин натощак (}\mu\text{Ед/мл)}] / 405$ .

Культура клеток. Были приобретены человеческие белые висцеральные преадипоциты (Каталожный номер #: C-12732; PromoCell) и мезенхимальные стволовые клетки человека (Каталожный номер #: C-12974; PromoCell), полученные из здорового костного мозга. Преадипоциты рассевали в соответствии с протоколом производителя и культивировали в среде для роста преадипоцитов (Каталожный номер #: C-27410; PromoCell) до конfluence. За один день до индукции конечного адипогенеза клетки инфицировали специфическими лентивирусными частицами, состоящими из пула 3 мишень-специфичных конструкций кшРНК, приобретенных у Santa Cruz Biotechnology, и на следующий день адипогенную дифференцировку индуцировали путем замены среды на среду для дифференцировки преадипоцитов (Каталожный номер # C-27436; PromoCell) на 2 дня. После стадии дифференцировки среду окончательно заменяли на среду Adipocyte Nutrition (Каталожный номер # C-27438; PromoCell). Для культуры без инсулина среду "Adipocyte Basal Medium" (Каталожный номер #: C-2431; PromoCell) без инсулина дополняли 5 г/л дезоксиглюкозы, 8 мкг/мл d-биотина, 400 нг/мл дексаметазона. В случае hMSCs их культивировали в ростовой среде для мезенхимальных стволовых клеток (каталожный номер #: C-28010; PromoCell) до конfluence. hMSC трансфицировали конкретными мРНК, как описано выше, и на следующий день липогенную дифференцировку индуцировали путем замены среды на среду "MSC Adipogenic Differentiation Medium" (Каталожный номер #: C28011; Promocell).

Выделение РНК, синтез кДНК, количественная ПЦР и Taqman. Тотальную РНК получали из различных тканей и клеток с помощью набора RiboPure™ (Каталожный номер #: AM1924; Ambion) с последующей обработкой ДНКазой с TURBO DNA-free™ (Каталожный номер #: AM 1907; Ambion). Целостность РНК оценивали с помощью гель-электрофореза и концентрацию РНК определяли с помощью Eppendorf Biophotometer Plus с кюветой Cell Hellma® Tray (Каталожный номер #: 105,810-UVS; Hellma). Обратную транскрипцию 1 мкг тотальной РНК в кДНК осуществляли с использованием набора для синтеза кДНК BioRad iScript™ (Каталожный номер #: 170-8891; BioRad). В режиме реального времени количественную амплификацию полимеразной цепной реакцией проводили в режиме реального времени в системе BioRad CFX96™ с помощью IQ™ SYBR® Green Supermix (Каталожный номер #: 170-8886; BioRad) и набора праймеров, оптимизированных для тестируемых мишеней для ПНР в реальном времени на основе SYBR Green для ПЦР в реальном времени. Анализ Taqman проводили со специфическим геномным анализом с помощью "TaqMan® Fast Advanced Master Mix" (Каталожный номер #: 4444557; Applied Biosystems). Нормализованную кратную экспрессию гена-мишени рассчитывали с использованием метода сравнительного порогового цикла (Ct), нормализуя Ct целевой мРНК к таковой для GAPDH с помощью CFX Manager Software Version 1.5 и проверяли с помощью программы Lin-Reg.

Вестерн-блоты и иммунофлуоресцентная микроскопия. Самцов  $\text{Alms1}^{\text{Toz/foz}}$  и однопометников дикого типа анестезировали. Следующие инсулин-чувствительные ткани: печень, сердце, мышечную и жировую ткани собирали и непосредственно помещали в RIPA-буфер (Трис 50 мМ, NaCl 150 мМ, 0,1% SDS, 1% Тритон-X100), дополненный полным коктейлем ингибиторов мини-протеаз и коктейлем ингибиторов фосфатаз PhosSTOP (Roche, Швейцария). Образцы обрабатывали ультразвуком и центрифугировали в течение 30 мин при 17000G, 4°C 30 мин. Концентрацию белка анализировали с помощью BCA-анализа (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные белки из клеток получали преципитацией трихлоруксусной кислотой и проводили иммуноблот-анализы с использованием 30-50 мкг общего белка. Связывание специфического антитела визуализировали с помощью субстрата "SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate" (Каталожный номер #: Lfl45954, Pierce) в системе визуализации BioRad Versadoc™ или имеджере ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Великобритания). Неспецифические белки, окрашенные Ponceau S, использовали в качестве контролей загрузки для нормализации сигнала, полученного после специфической иммунодетекции представляющего интерес белка с помощью программы "Bio-Rad Quantity One". Для иммунофлуоресцентных экспериментов клетки высевали в системе "рег-

manox 8-wells Lab-Tek II Chamber Slide" (Каталожный номер #: 177445; Nunc). Клетки обрабатывали, как указано. Затем клетки и криосрезы тканей обрабатывали для детекции белков после фиксации метанолом и пермеабелизации с помощью 0,1% тритона X-100. Микроскопические препараты монтировали для детекции с помощью среды для заливки Vectashield Mounting Medium (Каталожный номер #: H-1200; Vector Laboratories). Для просмотра ассоциированных с мембранами белки, клетки фиксировали в формалине в течение 15 мин и напрямую блокировали, а затем подвергали иммуноокрашиванию и съемке с использованием вертикального микроскопа Zeiss AxioImager Z2. Анализ изображений, 3D-реконструирование и эксперименты с серийной съёмкой с временным интервалом и эксперименты по отслеживанию эндосом осуществляли либо с помощью программы Zeiss AxioVision с соответствующими модулями 3D и Tracking Zeiss или с помощью платформы для получения изображений Zeiss Zen 2012.

Измерение флуоресценции. Преадипоциты культивировали в 96-луночном планшете и 12 лунок инфицировали либо лентивирусными частицами с ALMS1 кшРНК, либо лентивирусными частицами с CTRL кшРНК, и подвергали дифференцировке на следующий день в зрелые адипоциты. Через 3 недели, внутриклеточные триглицериды окрашивали с помощью красителя AdipoRed в соответствии с процедурой изготовителя и измеряли флуоресценцию на монохроматоре Tecan Infinite 200 QUAD4 (Tecan, Лион, Франция) на длине волны 520 нм. Полученные данные затем анализировали с помощью программного обеспечения Tecan Magellan Data Analysis с использованием в качестве контроля неокрашенных адипоцитов.

Эксперименты по коиммунопреципитации. Для экспериментов по коиммунопреципитации мы использовали набор "Dynabeads® Antibody Coupling kit" (Каталожный номер #: 143.11D, Invitrogen) в комбинации с набором "Dynabeads® co-immunoprecipitation kit" (Каталожный номер #: 143.21D, Invitrogen). hMSC культивировали до конfluence и адипогенную дифференцировку вызывали сменой среды. Через 7 дней после адипогенной дифференцировки, инициированной сменой среды, адипоциты культивировали с или без Ins за 24 ч до лизиса, затем лизировали в нативных условиях и использовали согласно набору. После иммунопреципитации и высвобождения с гранул образцы загружали на гель "NuPAGE 3-8% TrisAcetate" (каталожный номер: EA0375BOX, Invitrogen), с белковым стандартом "Hi Mark™ Prestained HMW Protein Standard" (Каталожный номер #: LC5699, Invitrogen).

Белковый препарат и идентификация с помощью масс-спектрометрии. Гидролиз в геле. Процедуру гидролиза в геле проводили, как описано Rabilloud et al. (ссылка). Приготовление кусочков геля до гидролиза трипсином осуществляли с помощью жидкостного робота-обработчика (QuadZ215, Gilson International, Франция). Вкратце, гелевые полосы промывали поочередно 100 мкл 25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, а затем 100 мкл 50% ацетонитрила (ACN) (3 мин промывка при встряхивании и жидкость сливали перед добавлением следующего растворителя). Этот цикл увлажнения/дегидратации повторяли дважды и кусочки геля сушили в течение 20 мин перед восстановлением (10 мМ ДТТ/25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> буфер при 56°C в течение 45 мин) и алкилированием (25 мМ йодацетамид/25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> буфер в течение 45 мин, при комнатной температуре). После этого пятна на геле снова промывали 3 циклами 25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/ACN поочередно. После 20 мин стадии сушки кусочки геля подвергали регидратации тремя объемами трипсина (Promega, V5111) 12,5 нг/мкл в 25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> буфере (свежезамороженном) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Трипсинизированные пептиды экстрагировали из геля путем энергичного встряхивания в течение 30 мин в адаптированном объеме 35% H<sub>2</sub>O/60% ACN/5% HCOOH и стадией обработки ультразвуком в течение 15 мин.

MALDI-TOF (TOF) масс-спектрометрия и поиск в базах данных. Измерение MALDI проводили на Autoflex III SmartBeam (Bruker-Daltonik GmbH, Бремен, Германия) матричном лазерном с десорбцией/ионизацией времяпролетном масс-спектрометре (MALDI-TOF TOF), используемом в рефлекторном положительном режиме. Мишень "Prespotted Anchorchip" (система PAC от Bruker Daltonik, Техническое примечание TN011) с матрицей HCCA использовали для анализа триптических гидролизатов. Полученные данные масс фингерпринтинга пептидов (PMF) и данные фингерпринтинга пептидных фрагментов (PFF) объединяли с помощью программного обеспечения Biotoools 3.2 (Bruker Daltonik) и переносили интранет-версию в поисковую систему MASCOT (Matrix Science, Лондон, Великобритания). Варибельные модификации (N-концевое белковое ацетилирование, окисление метионина и карбамидометилирование цистеина) и одно пропущенное трипсином расщепление приняли во внимание и ошибку пептидной массы ограничили до 50 ч./млн. Белки идентифицировали с помощью функции поиска данных против избыточной базы данных белковых последовательностей NCBI, а затем против базы данных, ограниченной человеческими последовательностями. Во всех результатах вероятностные баллы были выше, чем балл, установленный как значимый с р-значением, равным 0,05. NanoLC-MS/MS масс-спектрометрия и поиск в базах данных. Для анализа nanoLC-MS/MS пептиды были перенесены в стеклянные вставки, совместимые с системой LC-автосамплера (nanoLC-U3000, Dionex, США). Система ЖХ была соединена с масс-спектрометром ESI-Q-TOF (MicroTOFQ-II, Bruker, Германия). Метод заключался в 60 мин прогона при скорости потока 300 нл/мин с использованием градиента двух растворителей: А (99,9% воды : 0,1% муравьиной кислоты) и В (99,92% ацетонитрил : 0,08% муравьиной кислоты). Система включает: колонку 300 µm X 5 mm RepMap C18, используемую для преконцентрирования пептидов и колонку 75 µm X 150

mm C18, используемую для элюирования пептидов. Анализатор TOF калибровали каждый день: данные получали и обрабатывали автоматически с использованием программного обеспечения Hystar 2.8 и DataAnalysis 2.6. Последовательные поиски вначале в базе данных NCBI, а затем против базы данных, ограниченной человеком, осуществляли для каждого образца с использованием локальной версии Mascot 2.2 (MatrixScience, Великобритания) и ProteinScape 2.0 (Bruker, Германия). Относительное число ложноположительных сигналов (FPR) для идентификации белков оценивали с использованием базы данных обратных ловушек (reverse decoy): валидацию белка проводили с использованием FPR ниже 1%. Кроме того, белки, идентифицированные только по 1 пептиду, проверяли вручную: MS/MS спектры были проверены в соответствии с обычными правилами фрагментации.

In situ анализ близкого лигирования (PLA). Набор Duolink для in situ PLA с антимышиным ПЛЮС зондом и анти-кроличьим МИНУС зондом (Каталожные номера #: 90701 и 90602; OLink Bioscience) использовали в комбинации с соответствующими первичными антителами согласно методике производителя. Человеческие первичные преадипоциты и зрелые адипоциты культивировали в 8-луночном "Lab-Tek II chamber slide" (Nunc) и обрабатывали как для иммуофлуоресцентной микроскопии до стадии первичной инкубации с антителом. После промывки клетки декорировали PLA ПЛЮС и МИНУС зондами (разведение 1:20) в течение 2 ч при температуре 37°C.

Гибридизацию и лигирование зондов, амплификацию и конечную промывку SSC проводили в соответствии с методикой производителя. Перенос флуоресценции на основании белок-белковых взаимодействий визуализировали с использованием набора обнаружения Duolink 613 (OLink Bioscience) и получали изображения.

Статистика. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США). Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. Значимость результатов определяли с помощью двустороннего критерия Стьюдента или теста непараметрического U-критерия Манна-Уитни для статистического сравнения данных BMI и AUC. Значение  $P < 0,05$  учитывалось при определении статистической значимости и отмечено звездочкой.

С помощью первичных преадипоцитов человека в качестве модели in vitro авторы локализовали ALMS1 преимущественно в цитоплазматическом, а не, как ранее сообщалось, центросомном пуле. ALMS1 был подвергнут сайленсу во время адипогенеза, и хотя наблюдалось значительное снижение антиадипогенного фактора Pref-1, не было обнаружено никаких значительных различий в уровнях экспрессии проадипогенных факторов транскрипции, таких как cEBPs и PPAR $\gamma$ .

После сайленсинга ALMS1 в 2-недельных зрелых адипоцитах способность поглощения глюкозы оценивали с использованием меченого аналога глюкозы (2-NBDG). При отсутствии стимуляции инсулином в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 и контрольных зрелых адипоцитах поглощение 2-NBDG не детектировалось (фиг. 2A). С другой стороны, стимуляция инсулином приводит к повышенному потреблению 2-NBDG в контрольных зрелых адипоцитах человека (фиг. 2B, верхняя панель), но не в клетках, подвергнутых сайленсингу по ALMS1 (фиг. 2B, нижняя панель). В дополнение к снижению поглощения глюкозы в адипоцитах, подвергнутых сайленсингу по ALMS1, авторы наблюдали уменьшение внутриклеточных триглицеридов (TG) в этих клетках уже через неделю (фиг. 2C-D). Следует отметить, что это сниженное поглощение глюкозы в ALMS1-дефицитных адипоцитах не было связано со снижением фосфорилирования АКТ ниже по сигнальному пути инсулина, так как уровни pS473-АКТ после 30-минутной инкубации с инсулином были похожи как на уровни контрольных, так и подвергнутых сайленсингу по ALMS1 человеческих адипоцитов (фиг. 2E-F), что соответствует уровням фосфорилирования АКТ от нормальных до повышенных, наблюдавшихся ранее в мышечных адипоцитах  $Alms1^{foz/foz}$  (фиг. 1G).

Авторы далее исследовали динамику GLUT4 в адипоцитах человека в отсутствие ALMS1. Клеточная локализация инсулинового рецептора (IR) в плазматической мембране не нарушалась после сайленсинга ALMS1 и детектировалась вблизи плазматической мембраны (PM) в отсутствие инсулина (фиг. 2G, верхняя панель). В отличие от этого, в ALMS1-дефицитных адипоцитах в отсутствие инсулина GLUT4 утратил свою перинуклеарную локализацию и детектировался рассредоточено по всей цитоплазме клетки, а не в своей предполагаемой обычной перинуклеарной локализации (фиг. 2G, средние и нижние панели и 2H). При стимуляции инсулином наблюдалось движение GLUT4 к PM в пределах актиновой сетки (фиг. 2I) как в контрольных, так и в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах. Через 2 ч после стимуляции инсулином в отсутствие инсулина GLUT4 все еще обнаруживался рассредоточенным по всей цитоплазме подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитов, тогда как у контрольных адипоцитов GLUT4 соответствующим образом релокализовался в перинуклеарном области (фиг. 2J). Поскольку существует равновесие между экзоцитозом и эндоцитозом GLUT4-везикул в PM и из PM, авторы проверили, для исключения возможности, не из-за дефектного ли эндоцитоза GLUT4 происходит нарушение сортировки GLUT4 в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах. При исследовании динамики, ключевой молекулы эндоцитоза, не было выявлено различий в уровне белка или клеточной локализации после сайленсинга ALMS1 в адипоцитах. Кроме того, средние скорости меченых эндосом были похожи

между подвергнутыми сайленсингу по ALMS1 и контрольными адипоцитами, что является доводом против дефекта эндоцитоза, вызывающего сниженное наличие GLUT4 в PM в ответ на передачу сигналов инсулина.

Пример 3. ALMS1 требуется для направленной миграции TBC1D4 в PM в ответ на сигнал инсулина.

Для того чтобы понять молекулярный механизм, лежащий в основе влияния инактивации ALMS1 на локализацию GLUT4, авторы определили взаимодействие партнеров ALMS1 в человеческих адипоцитах. Иммунопреципитацию (IP) с использованием ALMS1 в качестве приманки проводили с использованием молодых зрелых человеческих адипоцитов (4 дня после переключения дифференцировки) с последующей идентификацией взаимодействующих с ALMS1 партнеров масс-спектрометрией. Среди белков, иммунопреципитированных с ALMS1, был TBC1D4, известная GTPаза субстрата АКТ, требуемая для правильного удержания GLUT4 в GLUT4-сортировочных везикулах (GSV) и для транслокации GLUT4 к клеточной мембране для внутриклеточного поглощения глюкозы.

Пример 4. Разработка модели структурной гомологии для ALMS1, TBC1D4 и  $\alpha$ PKC.

Поскольку кристаллическая структура Alms1 еще не получена, использовали *in silico* структурное моделирование гомологии для прогнозирования 3D-структуры ALMS1 и идентификации структурных мотивов, которые могут связывать потенциальные взаимодействующие лиганды (фиг. 3А-С).

Структурная модель ALMS1. Модель ALMS1 была построена с использованием метода моделирования фрагментов с помощью программы гомологичного моделирования, Modeller. Последовательность аминокислот для каждого экзона ALMS1 была направлена в профилированный поточный алгоритм, доступный на сервере PISRED на основании чего были идентифицированы подходящие шаблоны. Затем эти идентифицированные шаблонные белки выравнивали с соответствующими экзонными последовательностями и каждый экзон моделировали отдельно с помощью Modeller. Оптимизацию энергии и выбор моделей проводили на основании балла энергии дискретного оптимизированного белка. И, наконец, модели собирали для того, чтобы построить структуру полноразмерного ALMS1 и полноразмерный белок был расслаблен и минимизирован с помощью программы симуляции молекулярной динамики NAMD.

Структурная модель РТР-связывающего домена TBC1D4. РТР-связывающий домен TBC1D4 находится в пределах первых 160 остатков. Надежная структура гомологов, моделирующая структуру между РТР-связывающим доменом и Rab-связывающим доменом, не была определена. Кристаллическую структуру РТР-домена мышиноного Disabled-1 (Dab-1), INU2 (E-значение=5.2e-17), которая была идентифицирована на основании HMM-поиска по шаблону в швейцарской модели, использовали в качестве шаблона для построения РТР-связывающего домена TBC1D4.

Домен РТР из TBC1D4 взаимодействует с ALMS-1. Макромолекулярная стыковка была осуществлена с использованием алгоритма ClusPro 2.0. Остатки, расположенные на поверхности взаимодействия с перекрытием  $\geq 0,4$  Å рассматривались как взаимодействующие остатки. Interproscan показал, что ALMS-1 содержит WD40-подобный домен в пределах первых 3871 остатков. Белки, содержащие домен WD40, представляют собой семейство белков, функционирующих как каркасы для макромолекулярных взаимодействий.

РТР-связывающий домен TBC1D4 взаимодействует с ALMS1. Вначале РТР-связывающий домен и RabGTP-связывающий домен TBC1D4 соединяли с моделью ALMS1 с помощью сервера Cluspro 2 для определения наиболее вероятного участка взаимодействия. Затем оба домена соединяли с их соответствующими участками взаимодействия в ALMS1 с использованием AutoDock 4.2 и рассчитывали их аффинности связывания. На основании сродства РТР-связывающий домен TBC1D4 связывает ALMS1 с ~100 раз более высоким сродством по сравнению с RabGTP-связывающим доменом. Следовательно, авторы настоящего изобретения спрогнозировали, что РТР-связывающий домен может иметь более высокую вероятность взаимодействия с молекулой ALMS1 по сравнению с RabGTP-связывающим доменом.

Моделирование РТР-домена из TBC1D4. Домен связывания фосфотирозина в TBC1D4 смоделировали после идентификации подходящего шаблона из алгоритма идентификации шаблона швейцарской модели.

Стыковка РТР-домена и RabGTP-связывающего домена из TBC1D4 с ALMS1. Вначале РТР-связывающий домен и RabGTP-связывающий домен TBC1D4 соединяли с ALMS1 с использованием сервера Cluspro 2 и идентифицировали участок взаимодействия. Затем оба домена соединяли с их соответствующими участками взаимодействия с помощью AutoDock 4.2 и рассчитывали их аффинности связывания.

Прогнозируемые номера остатков ALMSM-1 с потенциалом взаимодействием с другим лигандом	65,66,69,72,73,74,75,76,77,78,80,87,2875,2876,2877,2878,2879,2880,2881,2882,2883,2884,2885,2887,2888,2889,2890,2892,2893,2894,2895,2897,2909,2910,2912,2929,2931,2932,2933,2934,2935,3557,3558,4131,144,145,146,147,148,149,150,151,193,194,195,198,199,200,201,205,208,211,214,226,227,229,233,234,235,236,239,242,243,246,248,249,250,251,252,314,319,321,986,1341,1344,2269,113,114,115,116,123,126,127,128,1340,1438,1439,1440,1441,1442,1443,1444,1446,1447,1448,1449,1450,1451,1452,1453,1454,1457,1458,1459,1478,1915,1918,1919,1920,1922,1923,1930,2041,2042,2043,2257,2267,2483,2484,3866,218,219,220,221,222,223,224,277,278,279,282,285,286,287,288,686,688,689,690,691,699,1856,1858,1859,1861,1862,1863,1864,1865,1866,1867,1868,1869,1870,1871,1872,1949,1968,1969,1971,1974,1979,1980,1981,1982,1983,1984,2104,2107,2111,2870,2872,2874,2915,3285,3286,3287,793,795,796,797,1285,1314,1408,1409,1422,1423,1425,1426,1427,1430,1431,1671,1672,1794,1797,2538,2539,2540,2555,2556,2557,2563,2564,2565,2567,2568,2588,2591,2599,2603,2699,2701,2702,3108
Прогнозируемые остатки ALMS1, опосредующие взаимодействие с $\alpha$ PKC	E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883, E2884
Прогнозируемые номера остатков $\alpha$ PKC, опосредующие взаимодействие с ALMS1	F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664, I667
Прогнозируемые остатки TBC1D4, опосредующие взаимодействие с ALMS1	G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82, I83
Прогнозируемые остатки ALMS1, опосредующие взаимодействие с TBC1D4	H65, L66, S2879

Модель гомологии показала, что Alms1 предположительно имеет структуру типа яблочный огрызок с большим количеством участков связывания с потенциальными лигандами, сосредоточенными вокруг сердечины. Кристаллическая структура TBC1D4 аналогичным образом не была получена, и поэтому авторы использовали подход гомологичного моделирования для предсказания структуры РТР-связывающего домена TBC1D4 (фиг. 3C-D). Затем проводили *in silico* исследования по стыковке, которые спрогнозировали высокое сродство связывания TBC1D4 с ALMS1 через водородные связи остатков TBC1D4 G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82, I83, которые взаимодействуют с остатками H65, L66, S2879 в Alms1 (фиг. 4A). Колокализацию ALMS1 и TBC1D4 затем подтверждали в адипоцитах человека иммунофлуоресцентными исследованиями (фиг. 4B). Далее тестировали уровни экспрессии GLUT4, TBC1D4 и IRAP в адипоцитах с сайленсингом ALMS1 с или без стимуляции инсулином, но никаких существенных различий не обнаружили (фиг. 4C). После фосфорилирования активированным АКТ фосфорилированный TBC1D4 (p-TBC1D4) в адипоцитах направленно воздействует на RAB-белки, такие как RAB14 и RAB10, перед направленной миграцией GSV в PM. Тем не менее, при стимуляции инсулином подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитов, в уровнях TBC1D4, p-TBC1D4, RAB14 и RAB10 не было обнаружено никакой разницы (фиг. 4). Авторы затем сфокусировались на клеточной локализации GLUT4. При отсутствии стимуляции инсулином сайленсинг TBC1D4 воспроизводит влияние сайленсинга ALMS1 в зрелых адипоцитах, т.е. нарушенная локализация GLUT4 по всей цитоплазме (фиг. 4E). В ответ на стимуляцию инсулином в контрольных адипоцитах GLUT4 высвобождается из перинуклеарной области, распространяется по всей цитоплазме адипоцитов (фиг. 4F), таким образом, воспроизводя картину распределения GLUT4, наблюдаемую в адипоцитах с сайленсингом по ALMS1 и TBC1D4 в отсутствие (фиг. 4E) и присутствии (фиг. 4F) инсулина. Авторы изобретения в дальнейшем исследовали влияние сайленсинга ALMS1 на клеточную динамику TBC1D4 в ответ на инсулин. В отсутствие инсулина TBC1D4 локализуется в перинуклеарной области как в контрольных, так и в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах (фиг. 4G), но, что примечательно, в ответ на инсулин TBC1D4 транспортировался в PM только в контрольных, но не в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах (фиг. 4H).

Пример 5. ALMS1 формирует динамический белковый комплекс, ALMS<sub>о</sub>му, необходимый для инсулин-стимулированного транспорта глюкозы в зрелых адипоцитах человека.

Хотя авторы изобретения показали, что сайленсинг ALMS1 предотвращает таргетирование TBC1D4 в PM, по-прежнему необъяснимо, объясняет ли это нарушение серьезное снижение потребления глюкозы, наблюдаемое в ALMS1-дефицитных адипоцитах. Поэтому авторы изобретения сравнили клеточное поглощение 2-NBDG при стимуляции инсулином в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 или TBC1D4 или контрольных адипоцитах и обнаружили отсутствие поглощения 2-NBDG в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах по сравнению с контрольными адипоцитами (фиг. 5A-B), при этом сниженное, по сравнению с контролем, фактическое количество 2-NBDG все еще поглощалось адипоцитами, подвергнутыми сайленсингу по TBC1D4 (фиг. 5C). Последующие анализы связывания антитела к GLUT4 либо в адипоцитах с сайленсингом ALMS1, либо с сайленсингом TBC1D4, либо контрольных адипоцитах после 30 мин стимуляции инсулином показали высокую долю GLUT4 в PM в контрольных адипоцитах и в адипоцитах с сайленсингом TBC1D4, но не клетках с сайленсингом ALMS1 (фиг. 5D-F), что указывает на то, что вторичный дефект при направленной миграции TBC1D4 в PM в клетках с сайленсингом Alms1 сам по себе не объясняет очень серьезный дефект транспорта глюкозы и экспрессии GLUT4 PM в ALMS1-дефицитных клетках. Дальнейшее изучение IP-данных по Alms1 выявило несколько субъединиц V типа АТРазных протонных (H<sup>+</sup>) насосов (A, B, D1 и G2), которые, как затем показали авторы, экспрессировались в зрелых адипоцитах (фиг. 5G) вместе с  $\alpha$ PKC, активирующей киназой H<sup>+</sup>-насосов под кон-

тролем инсулина. С помощью метода *in situ* PLA Duolink, нацеленного на ALMS1 и субъединицы A1 и D1 протонных насосов (фиг. 5H), а также с помощью коиммуноокрашивания ALMS1, A1 и D1 субъединиц V-АТФазы и  $\alpha$ PKC (фиг. 5H, I), авторы настоящего изобретения подтвердили, что ALMS1 находился в непосредственной близости к V-АТФазным  $H^+$ -насосам в зрелых адипоцитах в присутствии инсулина. ALMS1 колокализован с субъединицей V0D1 протонного насоса (фиг. 5I), которая встроена в мембрану GSV, что указывает на то, что в адипоците ALMS1 транспортируется вместе с протонными насосами, локализованными в GSV. С помощью структурной *in silico* модели партнеров, взаимодействующих с ALMS1, авторы определили мотив связывания PKC с Alms1. Сайты связывания для TBC1D4 и  $\alpha$ PKC на Alms1 находились так близко, что модель показала, что одновременное присоединение обоих белков на Alms1 не представлялось возможным из-за стерических затруднений (фиг. 5J). В следствие этого авторы выдвинули гипотезу. Чтобы проверить свою гипотезу о том, что в адипоцитах связывание ALMS1 с  $\alpha$ PKC или в ином случае с TBC1D4 находится под обратным контролем сигнального пути инсулина, авторы провели дополнительные IP, с использованием ALMS1 в качестве приманки, но на этот раз с применением зрелых адипоцитов человека, культивируемых в присутствии или в отсутствие инсулина, при этом провели иммуноблоттинг IP как по  $\alpha$ PKC, так и по TBC1D4. Результаты показали, что  $\alpha$ PKC осаждается только посредством Alms1 и детектируется иммуноблоттингом в экстрактах адипоцитов, инкубированных в отсутствие инсулина (фиг. 5K), тогда как TBC1D4 осаждается ALMS1 и детектируется в экстрактах адипоцитов, инкубированных в присутствии инсулина, в соответствии с авторской моделью рецепторного инсулин-регулируемого связывания Alms1 (фиг. 5L).

Пример 6. ALMSoma требуется для подкисления GSV перед доставкой GLUT4 в плазматическую мембрану.

Хотя было известно, что фосфорилирование TBC1D4 с помощью АКТ в некоторых случаях приводит к направленной миграции GLUT4, конечная стадия слияния GSV-PM является инсулин-регулируемым АКТ-независимым событием, которое требует осмотического набухания GSV под действием vАТФазных  $H^+$ -насосов. Тем не менее, отсутствовала информация о фактическом сигнале и механизме активации  $H^+$ -насосов инсулином. Авторы протестировали возможность предотвращения подкисления GSV при инактивации ALMS1 и, в следствие этого, химио-осмотического высвобождения GLUT4 в PM с помощью ацидотрофного красителя акридинового оранжевого, который испускает зеленую флуоресценцию при низкой концентрации, и оранжево-красную флуоресценцию при высоких концентрации в лизосомах, в которых акридиновый оранжевый протонируется и секвестрируется. В отсутствие инсулина в адипоцитах не была обнаружена оранжево-красная флуоресценция. Напротив, инсулин вызывал быстрое появление красного цвета в контрольных зрелых адипоцитах человека (фиг. 6A), но не в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах (фиг. 6B), что служит указанием потери инсулиноопосредованного подкисления лизосом в адипоцитах, подвергнутых сайленсингу по ALMS1.

Изобретатели затем проверили, действительно ли подкисление адипоцитов с сайленсингом по ALMS1 с помощью нигерицина (NIG), электронейтрального ионофора  $K^+/H^+$  обмена, о котором известно, что он вызывает осмотическое набухание GSV, может обойти Alms1-ассоциированный дефект слияния GLUT4 и поглощение глюкозы. Обработка NIG привела к быстрому подкислению как контрольных, так и подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитов (фиг. 6C-D), что привело к активации набухания и слияния внутриклеточных везикул. Параллельно с этим анализ электронной микроскопией показал везикулы, расположенные рядом с PM без слияния в отсутствие инсулина как в контрольных адипоцитах, так и в адипоцитах, подвергнутых сайленсингу по ALMS1 (фиг. 6E-F, верхние панели). Обработка инсулином вызывала набухание везикул (фиг. 6E, средние панели), ассоциированное со слиянием везикул с PM, для поглощения глюкозы только в контрольных адипоцитах (фиг. 6E, средние панели), но не в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах (фиг. 6F, средние панели). Однако NIG индуцировал везикулярное набухание и слияние с PM как в контрольных, так и в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах (фиг. 6E-F, нижние панели). Обработка NIG восстанавливала поглощение глюкозы в подвергнутых сайленсингу по ALMS1 адипоцитах. В то время как инсулин оказывает незначительное влияние на стимуляцию поглощения 2-NBDG в адипоцитах, подвергнутых сайленсингу по ALMS1 (фиг. 6G-H, верхняя и средняя панели), NIG не только восстановил слияние везикул, но и, как показано, восстановил поглощение 2-NBDG в адипоцитах, подвергнутых сайленсингу по ALMS1, до уровней, наблюдаемых в контрольных клетках (фиг. 6G-H, нижние панели).

Этот восстановленный транспорт глюкозы в обработанных NIG адипоцитах, подвергнутых сайленсингу по ALMS1, коррелировал с восстановленным GLUT4-слиянием с PM (фиг. 7A), но не с направленной миграцией TBC1D4 к PM (фиг. 7B); и привел к восстановлению TG-наполнения адипоцитов, подвергнутых сайленсингу по ALMS1, через 24 ч после обработки NIG.

Пример 7. Идентификация пептидных ингибиторов связывания PKC с Alms1.

После того как участок связывающего взаимодействия между двумя белками стал известен, стало возможно применить информацию о конформации и аминокислотах каждого белка, вовлеченных в опосредование данного взаимодействия, в компьютерных моделях для разработки пептидов или низкомолекулярных лекарственных веществ, которые при связывании с участком взаимодействия способны стерир-

чески или иным способом воспрепятствовать связывающему взаимодействию. Таким образом, авторы стремились идентифицировать пептиды, которые ингибируют взаимодействие ALMS1 и  $\alpha$ PKC или TBC1D4 с использованием их ранее описанных в примере 4 структурных моделей ALMS1, TBC1D4 и  $\alpha$ PKC. Спрогнозированные с помощью этого способа пептиды для блокировки взаимодействия между  $\alpha$ PKC и ALMS1, включают следующие последовательности: LDSDSHYGPQHLESIDD (SEQ ID NO: 5), DSHQTEETL (SEQ ID NO: 6), QQTLPESHLP (SEQ ID NO: 7), QALLDSHLPE (SEQ ID NO: 8), PADQMTDTP (SEQ ID NO: 9), HIPEEAQKVS AV (SEQ ID NO: 10) или SCIFLEQ (SEQ ID NO: 11). Пептид идентифицированный с помощью этого способа для блокировки взаимодействия между TBC1D4 и ALMS1 имел последовательность GCGAPAAREVILVL (SEQ ID NO: 12).

Пример 8. Экспрессия специфического ALMS1-взаимодействующего домена  $\alpha$ PKC в зрелых адипоцитах вызывает поглощение глюкозы в отсутствие инсулина.

Далее авторы проверили гипотезу о том, что инсулин опосредует высвобождение  $\alpha$ PKC из комплекса ALMSомы для индукции поглощения глюкозы. Для этого они клонировали взаимодействующий домен  $\alpha$ PKC (SEQ ID NO: 14 и 15) в лентивирусный вектор вместе с Flag-меткой. Выбранная последовательность была минимальной последовательностью  $\alpha$ PKC (min- $\alpha$ PKC-FLAG), не имеющей стерических затруднений с участком взаимодействия TBC1D4 с ALMS1. Экспрессированный в адипоцитах min- $\alpha$ PKC-FLAG конкурирует с эндогенным  $\alpha$ PKC, предотвращая его связывание с ALMSомой и, тем самым, благоприятствуя инсулин-опосредованному связыванию TBC1D4 с ALMSомой. Далее зрелые адипоциты инфицировали либо контрольными, либо min- $\alpha$ PKC-лентивирусными частицами для оценки влияния min- $\alpha$ PKC-FLAG на поглощение глюкозы. Через 48 ч после заражения min- $\alpha$ PKC-FLAG иммунодетектировали с использованием антитела против FLAG-метки (фиг. 9). Для *in vitro* доказательства мы обрабатывали зрелые адипоциты, как описано (фиг. 9), и затем инкубировали обработанные зрелые адипоциты с 2-NBDG для оценки влияния min- $\alpha$ PKC-FLAG на поглощение глюкозы. Интересно, что 2-NBDG поглощалась а в обработанных min- $\alpha$ PKC-FLAG адипоцитах в отсутствие INS (фиг. 8А, левая колонка), что соответствовало 3,5-кратному увеличению по сравнению с контролем (фиг. 8В). С другой стороны, никакой существенной разницы не наблюдалось в присутствии INS (фиг. 8А, правый столбец и 8В). Эти данные свидетельствуют о том, что направленное воздействие на взаимодействие ALMS1 и  $\alpha$ PKC достаточно для того, чтобы вызвать всасывание глюкозы в адипоцитах, независимо от наличия INS.

Получение лентивирусного вектора, несущего домен  $\alpha$ PKC.

ALMS1-взаимодействующий домен человеческого PKC $\alpha$  амплифицировали из кДНК человеческих клеток HEK293 с N-концевой FLAG-меткой с помощью прямого 5'-3'gtacGAATTCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGCTCACGGACTTCAATTTCTC (SEQ ID NO: 16) и обратного 5'-tagcGGATCCTCATACTGCACCTGTAAAGATGGG-3' (SEQ ID NO: 17) праймеров и клонировали в лентивирусный вектор PCDH-EF1-MCS-IRES-Puro (System Biosciences). Для получения вируса PKC $\alpha$ -лентивирусные векторы трансфицировали в клетки 293TN (System Biosciences) вместе с упаковывающими плазмидами psPAX2 и pMD2. G (Addgene) с массовым соотношением 3:2:1, соответственно, и с использованием Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Через 48 ч после трансфекции надосадочную жидкость культуры собирали центрифугированием при 500 $\times$ g в течение 10 мин с последующей фильтрацией через 0,45 мкм шприцевой фильтр с PES-мембраной (Sartorius). Раствор вируса затем концентрировали путем добавления 1/2 объема холодного 30% (мас./об.) PEG6000, растворенного в 0,5M NaCl, и инкубировали в течение ночи при 4 $^{\circ}$ C с периодическим перемешиванием. Смесь затем центрифугировали при 3000 $\times$ g в течение 15 мин при температуре 4 $^{\circ}$ C. Затем осадок, содержащий лентивирусные частицы, ресуспендировали в 1 мл DMEM среде и хранили при -80 $^{\circ}$ C до инфицирования клеток-мишеней.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение молекулы, предотвращающей связывание  $\alpha$ PKC (протеинкиназа C  $\alpha$ -типа) с ALMS1 (белок синдрома Альстрёма 1), при лечении или отсрочке развития или возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, где молекула выбрана из группы, состоящей из пептидов или полипептидов или пептидомиметиков, антител, их фрагментов или производных, аптамеров, шпигельмеров и химических соединений.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что молекула предназначена для применения при лечении или отсрочке развития или возникновения сахарного диабета 2 типа.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что молекула не препятствует связыванию TBC1D4 с ALMS1.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что молекула представляет собой пептид длиной менее чем 50 аминокислот, предпочтительно менее чем 20 аминокислот.

5. Применение по п.4, отличающееся тем, что молекула представляет собой пептид, содержащий

аминокислотную последовательность фрагмента ALMS1 (SEQ ID NO: 1).

6. Применение по п.5, отличающееся тем, что молекула представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента ALMS1, включающий один или несколько из остатков, которые, согласно прогнозам, опосредуют взаимодействие с  $\alpha$ ПКС, в частности один или несколько из остатков, выбранных из перечня, состоящего из E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883 и E2884.

7. Применение по п.5 или 6, отличающееся тем, что молекула представляет собой пептид, содержащий или состоящий из одной из следующих последовательностей:

LSDSDSHYGPQHLESIDD (SEQ ID NO: 5);

DSHQTEETL (SEQ ID NO: 6);

QQTLPESHLP (SEQ ID NO: 7);

QALLDSHLPE (SEQ ID NO: 8);

PADQMTDTP (SEQ ID NO: 9);

HIPEEAQKVS AV (SEQ ID NO: 10);

SCIFLEQ (SEQ ID NO: 11) и

их фрагмента, содержащего 6 смежных аминокислот.

8. Применение по п.4, отличающееся тем, что молекула представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента  $\alpha$ ПКС (SEQ ID NO: 4).

9. Применение по п.8, отличающееся тем, что молекула представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность фрагмента  $\alpha$ ПКС, включающую один или несколько из числа остатков, которые, согласно прогнозам, опосредуют взаимодействие с ALMS1, в частности один или несколько из числа остатков, выбранных из списка, состоящего из F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664 и I667.

10. Способ *in vitro* или *ex vivo* идентификации молекул, подходящих для лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, где способ включает стадии:

(а) анализ способности молекулы-кандидата предотвращать связывание  $\alpha$ ПКС с ALMS1; а также

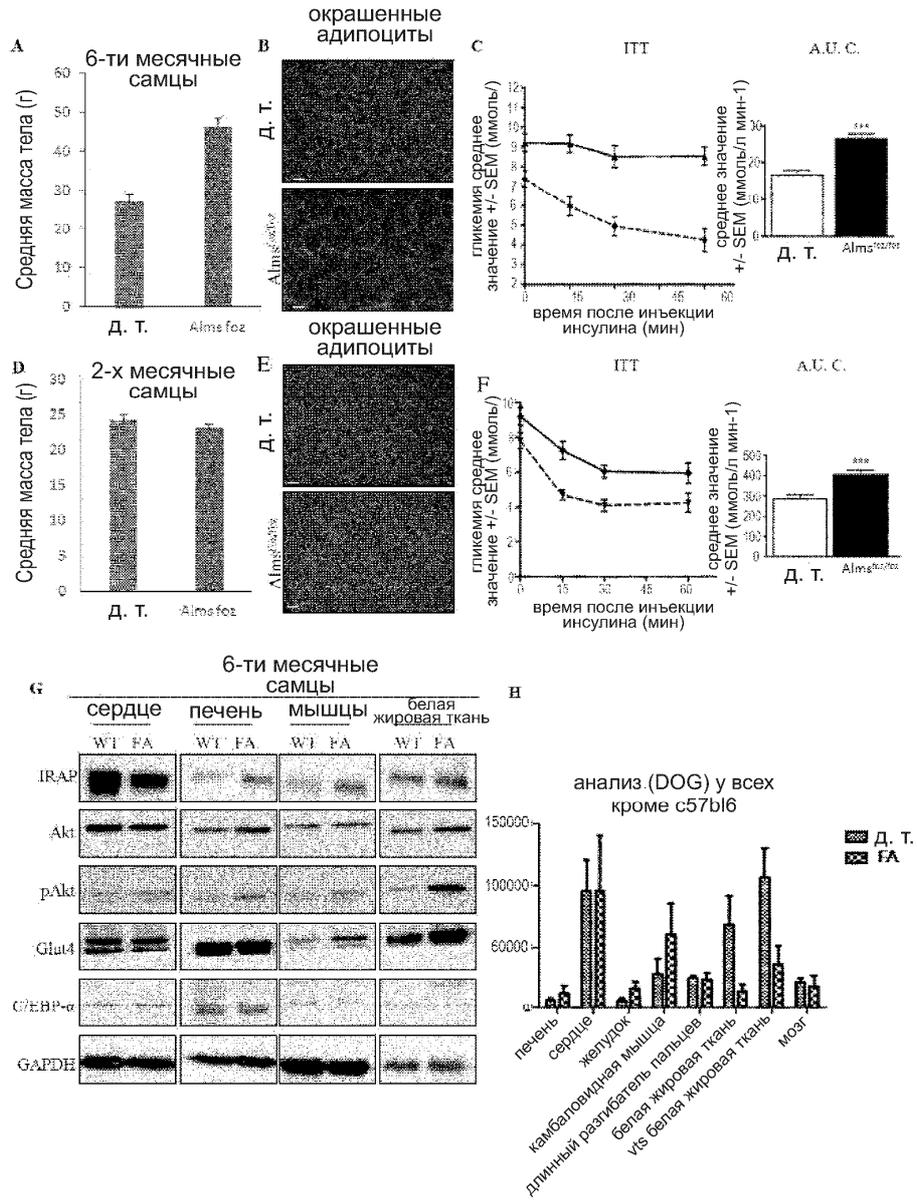
(б) отбор молекул, способных предотвращать связывание  $\alpha$ ПКС с ALMS1, для использования для лечения или замедления прогрессирования или отсрочки возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что способ дополнительно включает стадию, в которой тестируется способность выбранной молекулы мешать связыванию TBC1D4 с ALMS1 и в которой отбираются молекулы, которые не мешают связыванию.

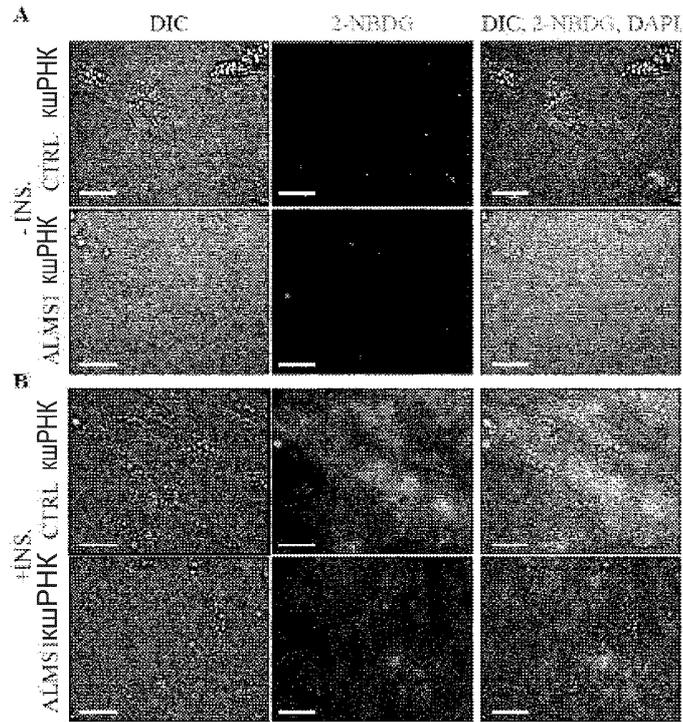
12. Способ по п.10 или 11, отличающийся тем, что связывание определяют в клеточной системе в ответ на инсулин.

13. Способ по любому одному из пп.10-12, отличающийся тем, что связывание определяют в присутствии и/или в отсутствие инсулина.

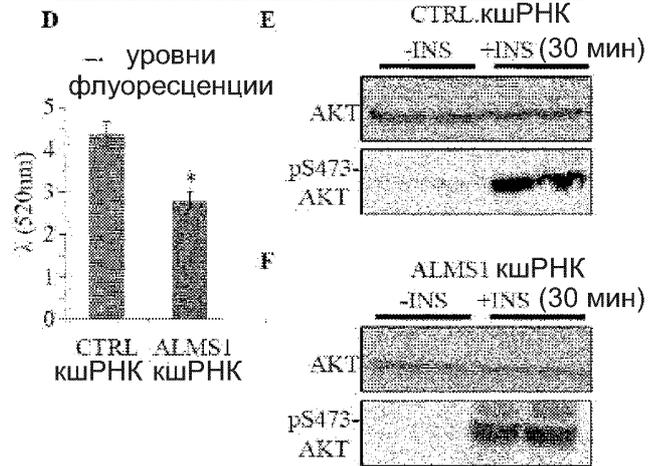
14. Применение молекулы, усиливающей связывание TBC1D4 с ALMS1, для лечения или отсрочки развития или возникновения сахарного диабета, резистентности к инсулину, диабетической ретинопатии, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, резистентности к инсулину, гипергликемии, ожирения и гиперинсулинемии, где молекула выбрана из группы, состоящей из пептидов или полипептидов или пептидомиметиков, антител, их фрагментов или производных, аптамеров, шпигельмеров и химических соединений.

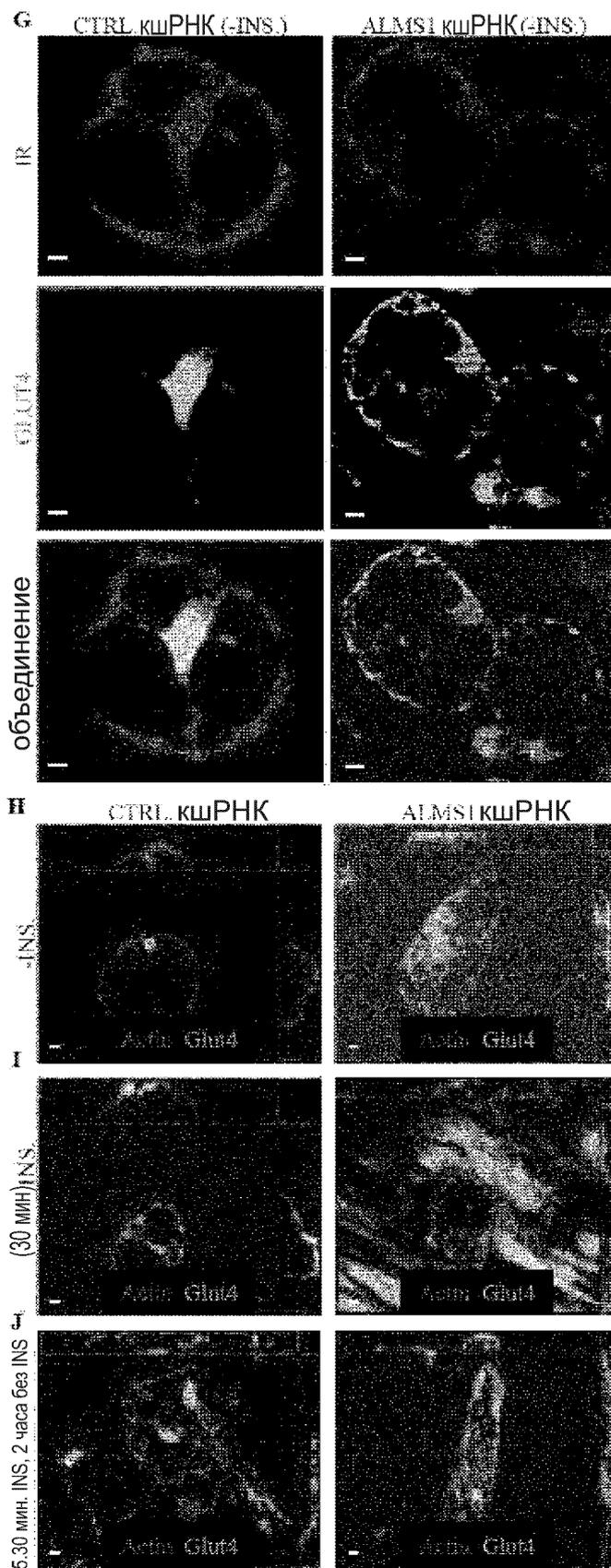


Фиг. 1

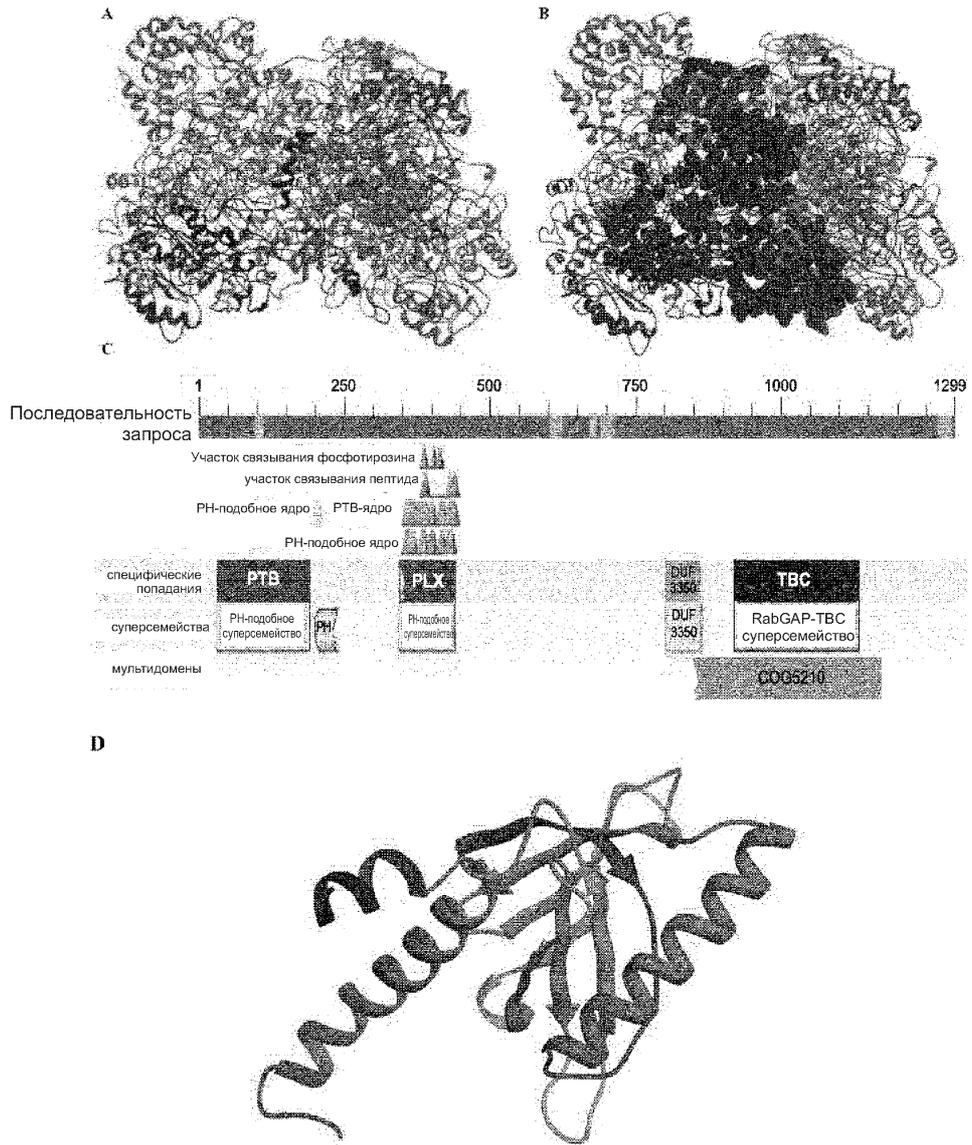


**С** 3-х недельные зрелые адипоциты  
CTRL. кшРНК      ALMS1 кшРНК



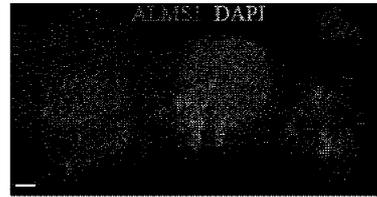
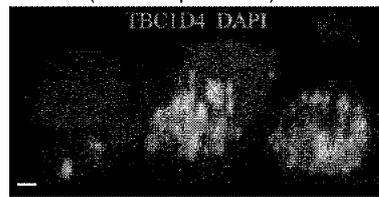
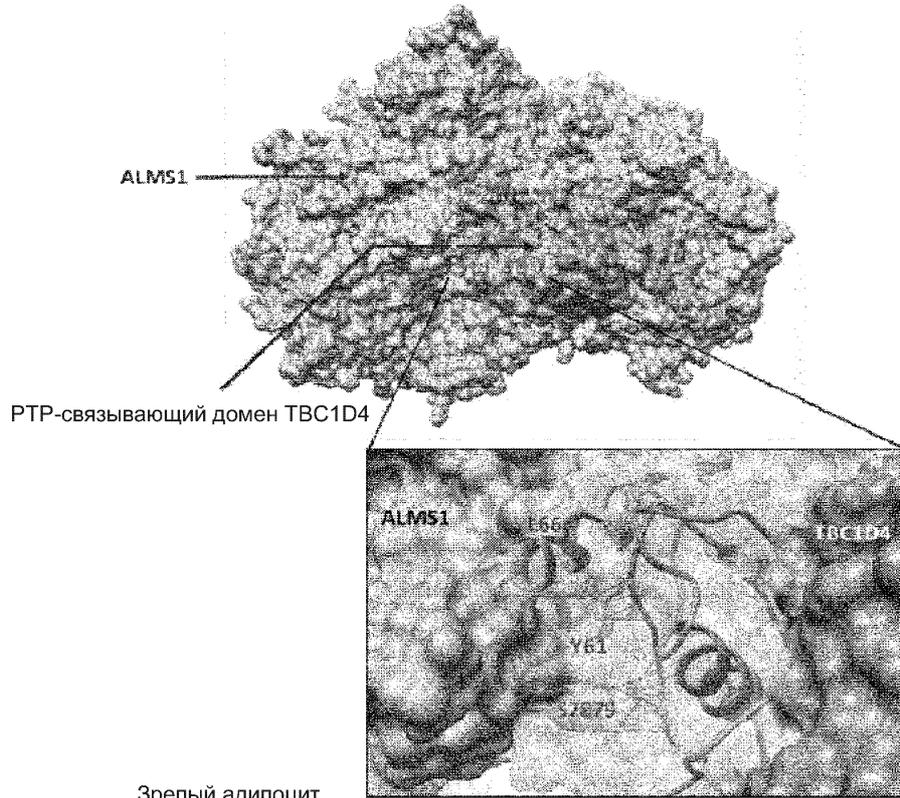


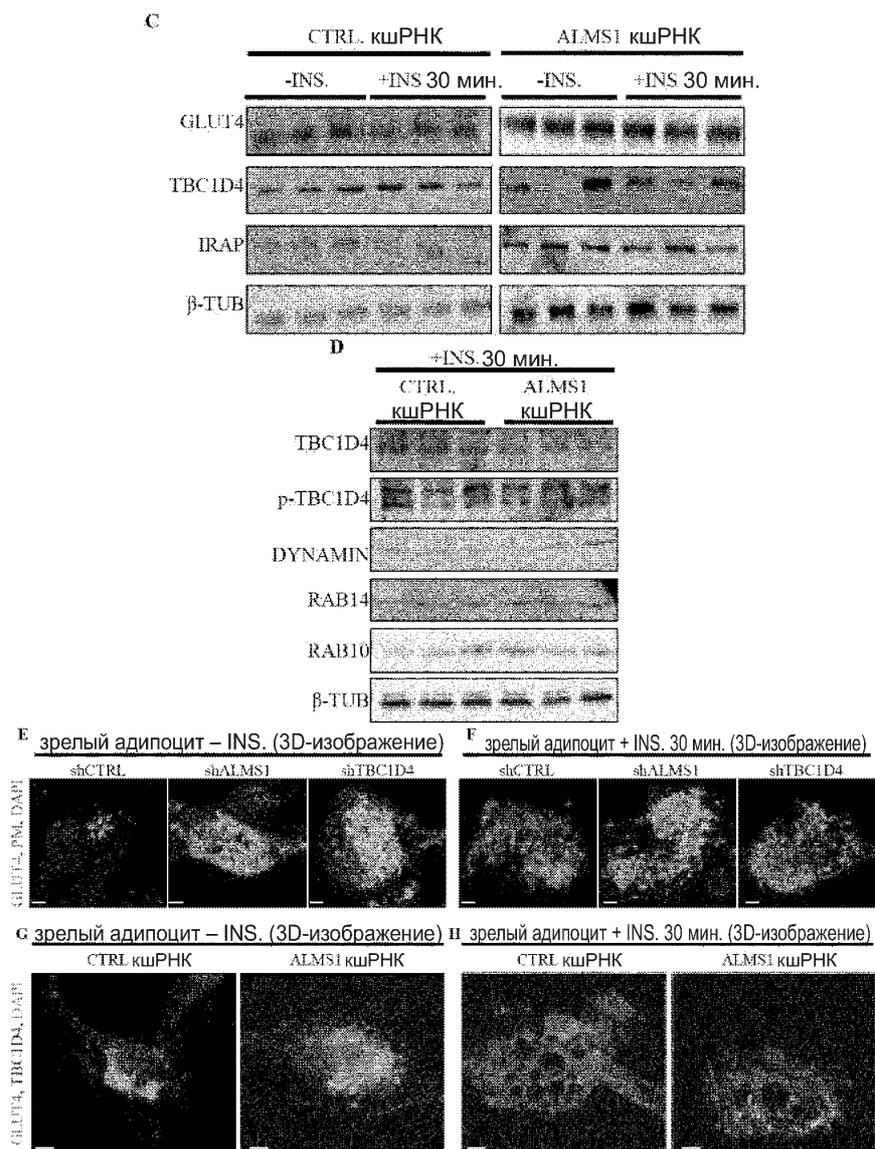
Фиг. 2

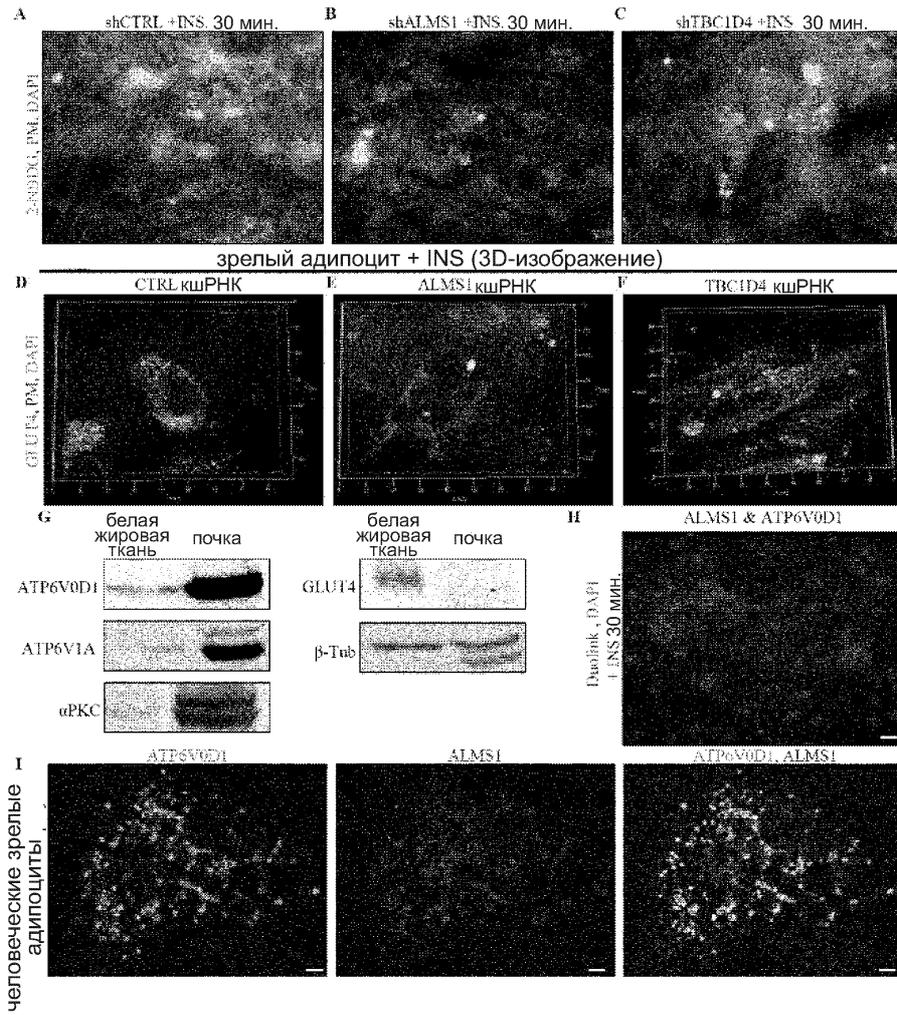


Фиг. 3

A

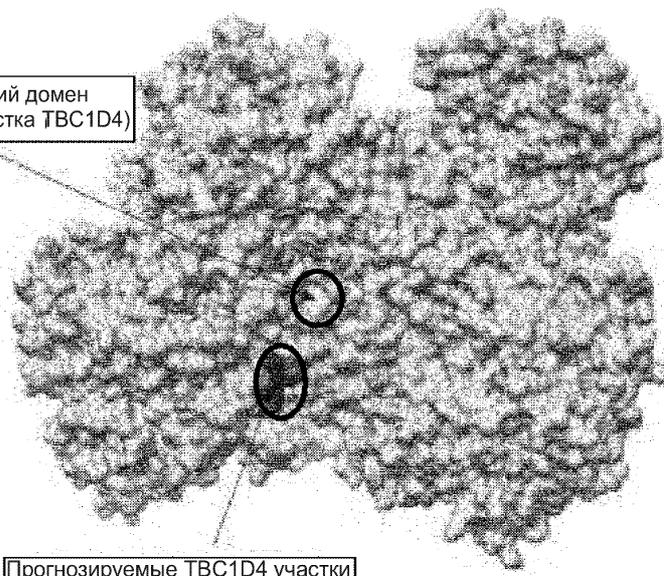




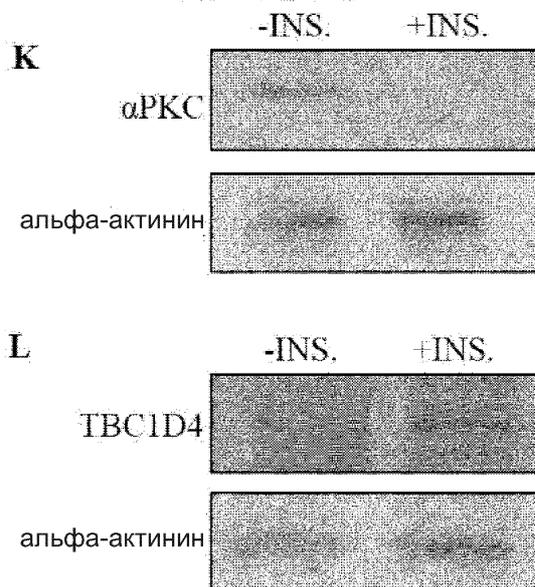


**Ж**

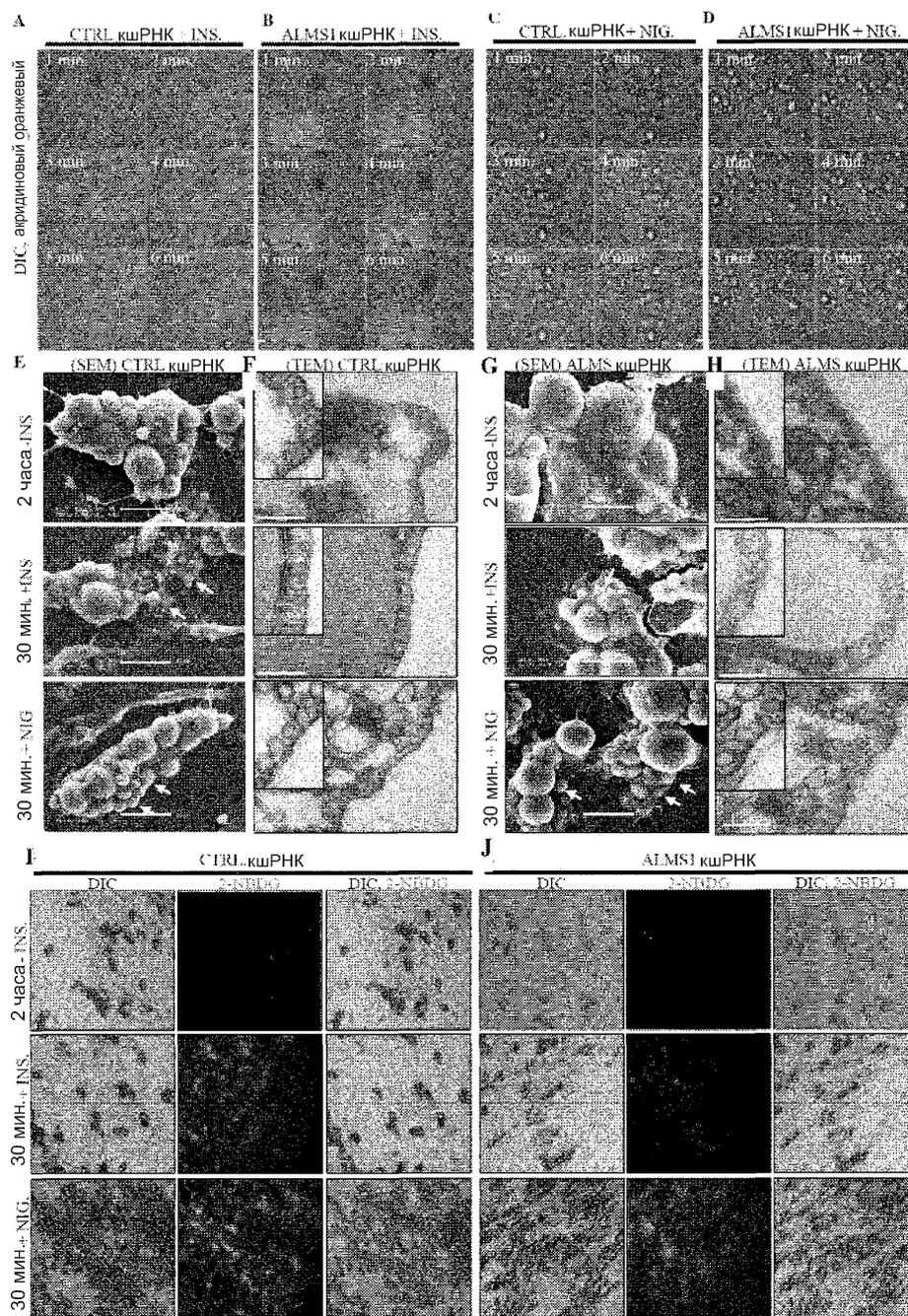
PKC-связывающий домен  
(~20 ангстрем от участка TBC1D4)



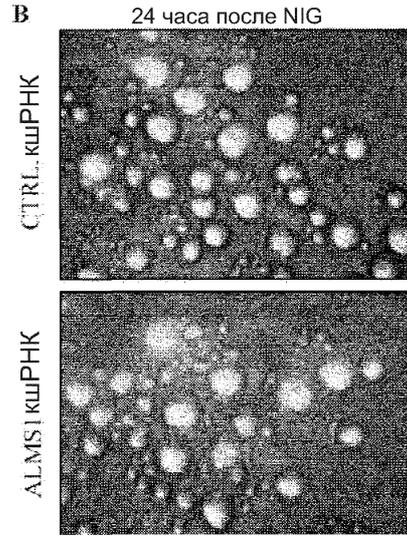
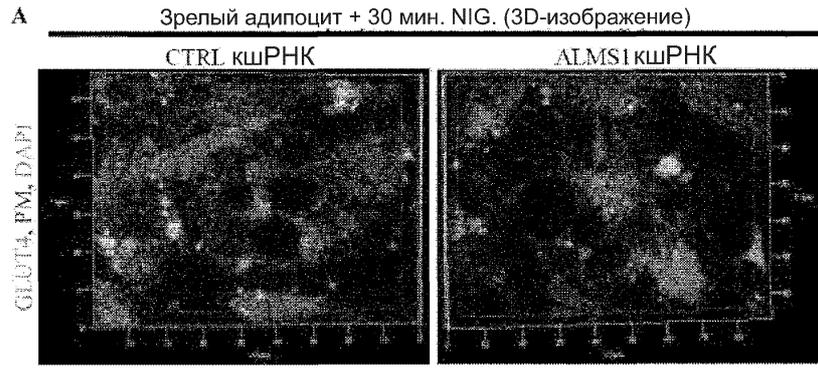
Прогнозируемые TBC1D4 участки  
связывания



Фиг. 5

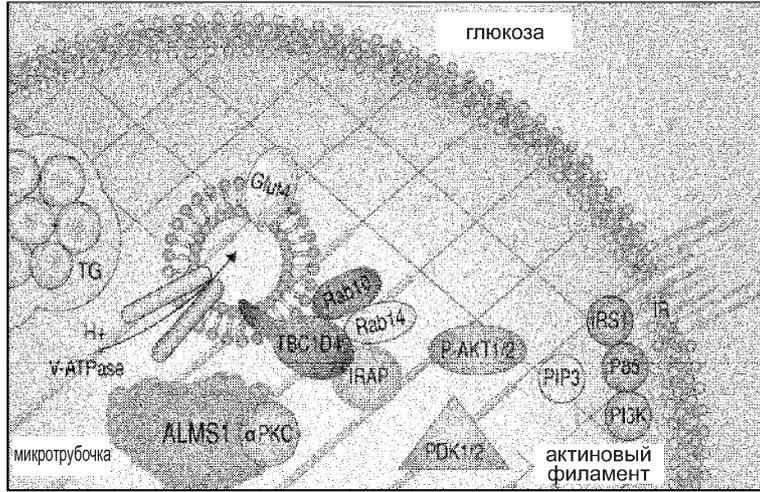


Фиг. 6



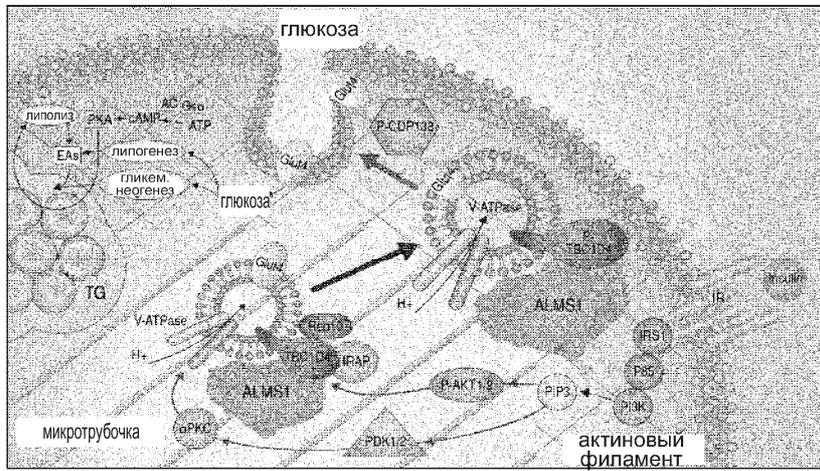
C

в отсутствие инсулина

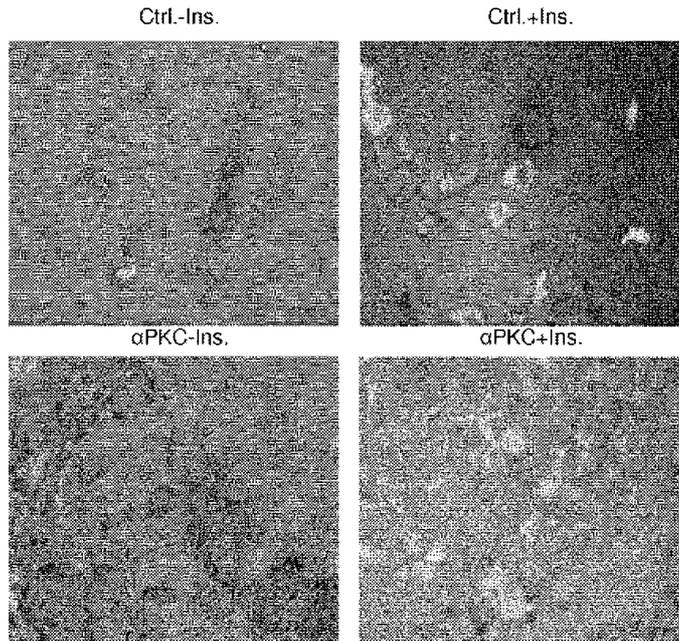


D

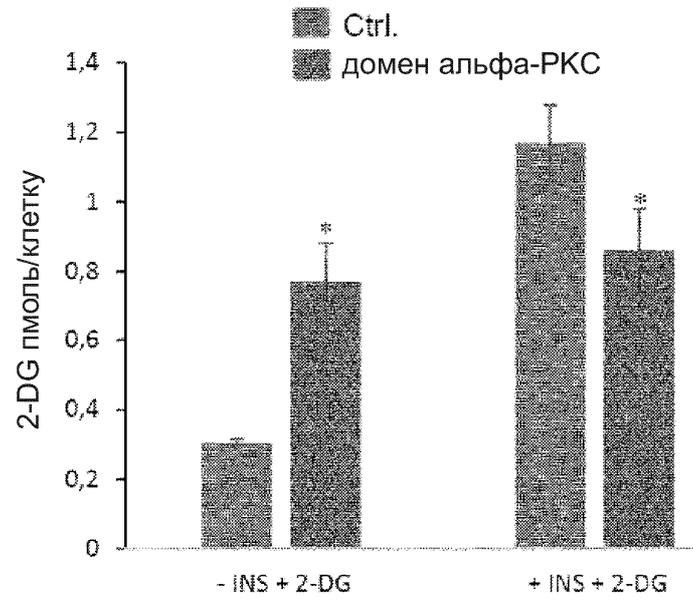
в присутствии инсулина



Фиг. 7



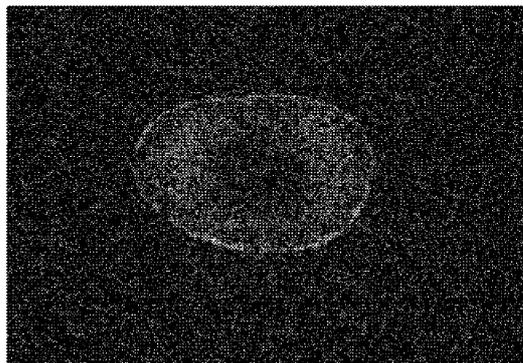
Фиг. 8A



Фиг. 8В

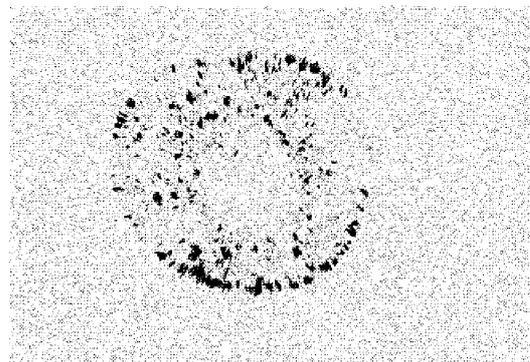
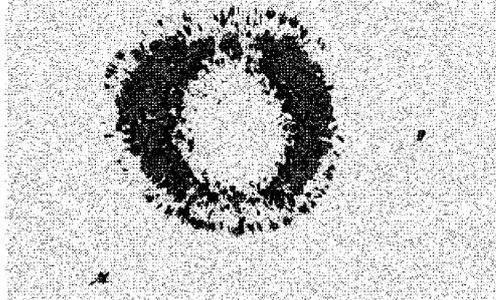
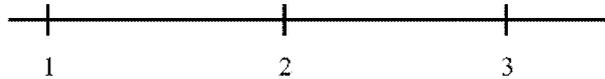
DAPI, Flag-Tag-альфа-РКС домен

зрелый алипозит



3D-изображение

DAPI

DAPI,  
Flag-Tag-альфа-РКС доменкультуральная среда  
+ INS / лентивирусная  
инфекциякультуральная  
среда – INS+/- 30 мин.  
перед тестами

1

2

3

дни

Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2