

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040421**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.30

(21) Номер заявки
201700507

(22) Дата подачи заявки
2016.05.04

(51) Int. Cl. **C07K 14/195** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИЯ, КЛЕТКИ, СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА,
ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДА И КЛЕТОК, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ**

(31) 15166598.1

(32) 2015.05.06

(33) EP

(43) 2018.05.31

(86) PCT/EP2016/060033

(87) WO 2016/177797 2016.11.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**УНИВЕРСИТЕ КАТОЛИК ДЕ
ЛУВЕН (BE); ВАГЕНИНГЕН
УНИВЕРСИТЕТ (NL)**

(72) Изобретатель:
**Кани Патрик Дэниэл (BE), Белзер
Клара, Де Вос Виллем Майндерт (NL)**

(74) Представитель:
Баландина Л.А. (RU)

(56) "SubName: Full=Uncharacterized protein {EC0:0000313|EMBL:ACD04926.1}; Flags: Precursor", UNIPROT, 1 July 2008 (2008-07-01), XP002744586, [retrieved on 2008-07-01] the whole document & Mark W. J. Van Passel ET AL: "The Genome of Akkermansia muciniphila, a Dedicated Intestinal Mucin Degradar, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes", PLoS ONE, vol. 6, no. 3, 3 March 2011 (2011-03-03), page e16876, XP55074483, DOI: 10.1371/journal.pone.0016876
WO-A2-2005030133

A. EVERARD ET AL: "Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, no. 22, 28 May 2013 (2013-05-28), pages 9066-9071, XP55074467, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1219451110 abstract

AMANDINE EVERARD ET AL: "Diabetes, obesity and gut microbiota", BEST PRACTICE & RESEARCH CLINICAL GASTROENTEROLOGY, vol. 27, no. 1, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 73-83, XP055213455, ISSN: 1521-6918, DOI: 10.1016/j.bpg.2013.03.007 page 78
WO-A2-2006101244

(57) Было обнаружено, что внеклеточный полипептид, полученный из Akkermansia muciniphila, способен модулировать и/или стимулировать функцию иммунной системы слизистой оболочки кишечника, и/или поддерживать, и/или восстанавливать метаболический статус, и/или повышать физическую целостность слизистого барьера кишечника у млекопитающего. Полипептид или клетки-хозяева, содержащие такой полипептид, могут использоваться для предотвращения и/или лечения разнообразных состояний за счет повышения физической целостности слизистого барьера кишечника и/или улучшения функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника и метаболического статуса.

B1

040421

040421

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к иммунной системе слизистой оболочки кишечника, слизистому барьеру кишечника, фармацевтическим, пищевым или кормовым композициям, содержащим полипептиды и/или клетки-хозяева, которые способны модулировать и/или стимулировать функцию иммунной системы слизистой оболочки кишечника и/или поддерживать и/или восстанавливать и/или повышать физическую целостность слизистого барьера кишечника и/или поддерживать и/или восстанавливать и/или улучшать глюкозный и/или холестеринный и/или триглицеридный гомеостаз у млекопитающего (например, человека). Более точно, в настоящем изобретении предложены композиции, содержащие полипептид Amuc-1100 или его варианты. Было обнаружено, что Amuc-1100 способен взаимодействовать с toll-подобным рецептором 2 (TLR2) и/или модулировать TLR2 и/или NFκ-B-зависимый сигнальный путь и/или стимулировать высвобождение цитокинов (например, IL-6, IL-8 и IL-10) из иммунных клеток, находящихся вблизи слизистого барьера кишечника млекопитающего (например, человека), и/или способен поддерживать, восстанавливать или повышать физическую целостность слизистого барьера кишечника и/или поддерживать и/или восстанавливать и/или улучшать глюкозный и/или холестеринный и/или триглицеридный гомеостаз у млекопитающего и/или способен улучшать метаболический или иммунный статус млекопитающего. Полипептид Amuc-1100 может использоваться для предотвращения или лечения разнообразных указанных в изобретении заболеваний или состояний.

Предшествующий уровень техники

Считается, что повышенная проницаемость или сверхпроницаемость слизистой оболочки кишечника играет определенную роль при различных заболеваниях и состояниях, таких как кишечные заболевания, аутоиммунные заболевания, аллергии, рак, диабет типа 2, ожирение, депрессия, беспокойство и многие другие. По этой причине существует повышенный интерес к пониманию роли дисфункции слизистого барьера кишечника в патогенезе многих состояний, поражающих желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) у млекопитающего.

В нормальных условиях слизистый барьер кишечника действует как селективный барьер, допускающий всасывание питательных веществ, электролитов и воды и предотвращающий воздействие вредных макромолекул, микроорганизмов, пищевых и микробных антигенов (например, пищевых аллергенов). Слизистый барьер кишечника состоит преимущественно из слоя слизи и подстилающего слоя эпителиальных клеток (далее - эпителиальные клетки кишечника). Эпителиальные клетки кишечника тесно связаны друг с другом так называемыми "плотными соединениями", которые в основном являются "физическими сочленениями" между мембранами двух эпителиальных клеток кишечника. Поддержание слизистого барьера кишечника, в частности поддержание физической целостности слоя эпителиальных клеток кишечника (т.е. сохранение соединений между клетками) имеет решающее значение для защиты организма-хозяина от миграции из кишечника в кровоток патогенных микроорганизмов, антигенов и других нежелательных агентов.

Слизистый барьер кишечника также сильно колонизирован симбиотическими микроорганизмами (приблизительно 10^{12} - 10^{14}), в основном анаэробными или микроаэрофильными бактериями, большинство из которых живет в симбиозе с организмом-хозяином. Эти бактерии во многих отношениях полезны для организма-хозяина. Они обеспечивают защиту от патогенных бактерий и играют определенную роль в питании организма-хозяина путем синтеза витамина К и некоторых компонентов комплекса витамина В. Кроме того, слизистый барьер кишечника развил сложную "иммунную систему слизистой оболочки кишечника" с целью различения симбиотических (т.е. полезных) бактерий и патогенных бактерий и других вредных агентов. Иммунная система слизистой оболочки кишечника является неотъемлемой частью слизистой оболочки кишечника и содержит лимфоидные ткани и специализированные иммунные клетки (т.е. лимфоциты и плазматиты), которые широко рассеяны по всему слизистому барьеру кишечника. Одним из микроорганизмов, естественным образом колонизирующим слизистую оболочку здоровых субъектов, являются разлагающие муцин бактерии *Akkermansia muciniphila*, которые, как было продемонстрировано, усиливают барьерную функцию кишечника (Everard и др., PNAS 110 (2013) 9066-71; Reunanen и др., Appl Environ Microbiol March 20, 2015) и тем самым влияют на заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией кишечника.

При определенных обстоятельствах слизистый барьер кишечника может являться уязвимым для разнообразных инфекционных организмов или агентов, обычно не способных проникать через слизистый барьер кишечника, но которым, тем не менее, удается преодолеть его (например, через промежутки, возникающие из-за рыхлых плотных соединений между клетками кишечного эпителия). Организмы или другие агенты, которые преодолевают слизистый барьер кишечника, могут вызывать заболевания или другие нежелательные состояния (например, аллергии) в организме-хозяине. Примеры таких заболеваний включают ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или нарушения, связанные с инсулинорезистентностью, диабет типа 2, диабет типа 1, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертонию, сердечную патологию, инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени, алкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с ожирением (увеличением веса), аллергию, астму, аутизм, болезнь Пар-

кинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессию, другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, заживление ран, нарушения поведения, алкогольную зависимость, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, атеросклероз, синдром апноэ во сне, остеоартрит, болезнь желчного пузыря и рак.

Напротив, такие заболевания, как упомянуты выше, а также другие состояния, такие как пищевая аллергия, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействие радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис и т.п., могут изменять физическую целостность слизистого барьера кишечника (т.е. вызывать ослабление плотных соединений между эпителиальными клетками кишечника), что, в свою очередь, может позволять нежелательным микроорганизмам или другим агентам проникать через слизистый барьер кишечника организма-хозяина.

В прошлом разработано несколько вакцин и/или антител, нацеленных на такие микроорганизмы или агенты. Однако успех такого подхода нивелируется тем, что вакцины или антитела не способны эффективно нацеливаться на некоторые микроорганизмы или агенты или уничтожать их.

Также изучены другие подходы, имеющие целью, прежде всего, помешать вредным микроорганизмам и другим агентам проникать через слизистый барьер кишечника организма-хозяина и/или предотвратить повышенную проницаемость слизистого барьера кишечника. Например, разработаны композиции, содержащие глутаминовую кислоту, для предотвращения и/или лечения состояний, связанных с повышенной проницаемостью слизистой оболочки кишечника (WO 01/58283). В этих же целях также использовались другие вещества, включая спермин и спермидин и их предшественники (Dorhout и др. (1997), British J. Nutrition, стр. 639-654). С целью модулирования слизистого барьера кишечника также разработаны содержащие арабиноксилан препараты, способствующие благоприятному воздействию на желудочно-кишечные бактерии, живущие вблизи слизистого барьера кишечника (US 2012/0230955).

В основу настоящего изобретения положена задача создания агентов и/или содержащих такие агенты композиций, которые применимы для поддержания и/или восстановления и/или повышения физической целостности слизистого барьера кишечника и/или для предотвращения повышенной проницаемости слизистого барьера кишечника у млекопитающего (например, человека) и/или для поддержания и/или восстановления и/или улучшения глюкозного и/или холестеринowego и/или триглицеридного гомеостаза у млекопитающего, чтобы тем самым предпочтительно предотвращать или лечить заболевания или состояния, связанные с субоптимальной проницаемостью слизистого барьера кишечника и/или с дисбалансом глюкозного и/или холестеринowego и/или триглицеридного гомеостаза у упомянутого млекопитающего. В качестве альтернативы или дополнительно, задачей настоящего изобретения является создание агентов и/или содержащих такие агенты композиций, которые применимы для модулирования и/или стимулирования функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника у млекопитающего.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложена композиция, содержащая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способный осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или на глюкозный и/или холестериновый и/или триглицеридный гомеостаз, и фармацевтически приемлемый или приемлемый с пищевой точки зрения носитель.

Композицией может являться пищевая композиция или фармацевтическая композиция.

В изобретении также предложена генетически модифицированная клетка-хозяин, в геном которой введена молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, включающей а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине последовательности SEQ ID NO: 2; и б) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способный осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или на глюкозный и/или холестериновый и/или триглицеридный гомеостаз.

Кроме того, в изобретении предложена генетически модифицированная клетка-хозяин, не относящаяся к виду *Akkermansia muciniphilla* и содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и б) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способный осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или на глюкозный и/или холестериновый и/или триглицеридный гомеостаз.

Помимо этого, в изобретении предложена модифицированная клетка-хозяин, относящаяся к виду

Akkermansia muciniphila, в геном которой введена молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, включающей: а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и б) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способный осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или на глюкозный и/или холестеринный и/или триглицеридный гомеостаз.

В изобретении дополнительно предложен способ получения полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или на глюкозный и/или холестеринный и/или триглицеридный гомеостаз, при этом способ включает стадии: а) культивирования клетки-хозяина по любому из пп.3-5 в условиях, позволяющих получать упомянутый полипептид; и б) необязательно выделения полипептида, полученного на стадии (а).

В изобретении также предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способный осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, описанная клетка-хозяин или описанная композиция для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения при стимулировании функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника, для поддержания, восстановления и/или улучшения глюкозного и/или холестеринного и/или триглицеридного гомеостаза или для поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности слизистого барьера кишечника у млекопитающего.

Упомянутые полипептид, композиция или клетка-хозяин могут использоваться для профилактики и/или лечения у млекопитающего нарушения, выбранного из группы, включающей ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или нарушения, связанные с инсулинорезистентностью, диабет типа 2, диабет типа 1, гестационный диабет, преэклампсию, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертонию, сердечную патологию, инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени, алкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с ожирением (увеличением веса), аллергию, астму, аутизм, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессию, другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, заживление ран, нарушения поведения, алкогольную зависимость, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, атеросклероз, синдром апноэ во сне, остеоартрит, болезнь желчного пузыря, рак и состояния, изменяющие физическую целостность слизистого барьера кишечника, такие как пищевые аллергии, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействие радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис и т.п.

В качестве альтернативы или дополнительно упомянутый полипептид, клетка-хозяин или композиция могут использоваться для содействия противовоспалительной активности в кишечнике млекопитающего и/или для стимулирования потери веса у млекопитающего.

В изобретении также предложен способ лечения и/или профилактики у млекопитающего нарушения, выбранного из группы, включающей ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или нарушения, связанные с инсулинорезистентностью, диабет типа 2, диабет типа 1, гестационный диабет, преэклампсию, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертонию, сердечную патологию, инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени, алкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системой, связанную с ожирением (увеличением веса), аллергию, астму, аутизм, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессию, другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, заживление ран, нарушения поведения, алкогольную зависимость, сердечнососудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, атеросклероз, синдром апноэ во сне, остеоартрит, болезнь желчного пузыря, рак и состояния, которые изменяют физическую целостность слизистого барьера кишечника, такие как пищевая аллергия, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействие радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис и т.п., с целью содействия снижению веса у млекопитающего, содействия противовоспалительной активности в кишечнике млекопитающего, стимулирования функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника у млекопитающего, поддержания, восстановления и/или улучшения глюкозного и/или холестеринного и/или триглицеридного гомеостаза у млекопитающего или поддержания, восстановления и/или повышения физической целост-

ности слизистого барьера кишечника млекопитающего, при этом способ включает стадию введения нуждающемуся в этом млекопитающему эффективного количества полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или влиять на глюкозный и/или холестеринный и/или триглицеридный гомеостаз, клетки-хозяина согласно изобретению или композиции согласно изобретению.

Кроме того, в изобретении предложен способ получения полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или на глюкозный и/или холестеринный и/или триглицеридный гомеостаз, при этом способ включает стадии: а) культивирования бактерий вида *Akkermansia muciniphila* в применимой культуральной среде; и б) необязательно выделения полипептида, полученного на стадии (а).

Общие определения

В контексте настоящего изобретения термин "полипептид" равнозначен термину "белок". Полипептид имеет конкретную аминокислотную последовательность. "Вариант" полипептида согласно настоящему изобретению предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную последовательности полипептида согласно настоящему изобретению. Полипептид по изобретению выделяют, когда он больше не находится в своей естественной среде, т.е. когда он больше не находится в окружении фимбрий и/или в окружении клеток, таких как клетки *Akkermansia muciniphila*.

Используемый термин "идентичность последовательностей" или "сходство последовательностей" относится к ситуации, когда аминокислотная последовательность или последовательность нуклеиновых кислот идентичны или сходны с другой контрольной аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновых кислот. "Идентичность последовательностей" или "сходство последовательностей" может определяться путем выравнивания двух полипептидов или двух нуклеотидных последовательностей с использованием глобальных или локальных алгоритмов выравнивания. Затем последовательности могут именоваться "преимущественно идентичными" или "преимущественно сходными", когда они (при оптимальном совмещении, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием параметров по умолчанию) имеют, по меньшей мере, определенный минимальный процент идентичности (согласно определению, данному далее). В GAP используется алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей их длине с доведением до максимума числа совпадений и со сведением к минимуму числа разрывов. Обычно используются параметры GAP по умолчанию, при этом штраф за создание разрыва=50 (нуклеотидов)/8 (белков), а штраф за расширение разрыва=3 (нуклеотида)/2 (белка). Матрицей оценки по умолчанию для белков является Blosom62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Выравнивания и оценки последовательностей для установления идентичности последовательностей в процентах могут определяться с использованием компьютерных программ, таких как версия 10.3 пакета программ GCG Wisconsin компании Accelrys Inc. (9685 Скрантон-роуд, Сан-Диего, штат Калифорния 92121-3752, США) или версии 2.10.0 программы Emboss-Win (с использованием программной "иглы"). В качестве альтернативы, сходство или идентичность в процентах может определяться путем поиска в базах данных с использованием таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д. Идентичность последовательностей предпочтительно означает идентичность последовательностей по всей их длине.

Термин "трансэпителиальная резистентность" (ТЭР) является показателем проницаемости слоя эпителиальных клеток *in vitro*. Повышенную эпителиальную проницаемость связывают с ослаблением плотных соединений и снижением ТЭР.

Используемый в описании термин "химерный ген" относится к любому не встречающемуся в природе гену, т.е. гену, который обычно не встречается в природе у какого-либо вида, в частности гену, у которого одна или несколько частей последовательности нуклеиновых кислот не связаны друг с другом в природе. Например, в природе промотор не связан частью или со всей транскрибируемой областью или с другой регуляторной областью. Под термином "химерный ген" подразумеваются экспрессирующие конструкции, гетерологичный промотор или регуляторная последовательность транскрипции которых оперативно связана с одной или несколькими кодирующими последовательностями и необязательно с 3'-нетранслируемой областью (3'-НТО). В качестве альтернативы, химерный ген может содержать промотор, кодирующий последовательность и необязательно 3'-НТО, которые получены из одного и того же вида, но не встречаются в природе в этом сочетании.

Используемый в описании термин "генетически модифицированная клетка-хозяин" относится к клеткам, которые генетически модифицированы, например, путем введения последовательности экзогенных нуклеиновых кислот (например, SEQ ID NO: 2 согласно изобретению) или путем специфического изменения последовательности эндогенных генов. Такие клетки могли быть генетически модифицирова-

ны путем введения, например, одной или нескольких мутаций, вставок и/или делеций в эндогенный ген и/или введения генетической конструкции (например, вектора или химерного гена) в геном. Генетически модифицированные клетки-хозяева могут относиться к выделенным клеткам или к клеточным культурам. Генетически модифицированными клетками могут являться "трансдуцированные клетки", которые были инфицированы, в частности, модифицированным вирусом, при этом может использоваться, например ретровирус, а также другие применимые вирусы, такие как лентивирусы. Также могут использоваться невирусные методы, такие как трансфекции. Таким образом, генетическими модифицированными клетками-хозяевами также могут являться "постоянно трансфицированные клетки" или "временно трансфицированные клетки". Трансфекция относится к невирусным методам переноса ДНК (или РНК) в клетки, в результате чего происходит экспрессия гена. Из техники широко известны методы трансфекции, такие как опосредованная фосфатом кальция, опосредованная ПЭГ, опосредованная липосомами или липоплексами трансфекция нуклеиновых кислот и т.п. Такая трансфекция может являться временной, но также может являться постоянной, при этом клетки, в геном которых интегрирована генная конструкция, могут выбираться.

Используемый в описании термин "эффективное количество" относится к количеству, необходимому для достижения описанного в изобретении эффекта. Например, эффективным количеством полипептида или созданной методами генной инженерии клетки-хозяина согласно изобретению является количество, которое эффективно применимо для модулирования и/или стимулирования функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника и/или поддержания и/или восстановления и/или повышения физической целостности слизистого барьера кишечника (например, для стимулирования формирования более плотного соединения между клетками эпителия кишечника) и/или для модулирования и/или стимулирования сигнального пути toll-подобных рецепторов (например, TLR2) в иммунной клетке и/или для увеличения продуцирования цитокинов (например, IL-6, IL-8 и IL-10) в иммунной клетке и/или для профилактики и/или лечения нарушений или состояний, таких как ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или нарушения, связанные с инсулинорезистентностью, диабет типа 2, диабет 1 типа, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертония, сердечная патология, инсульт, неалкогольная жировая болезнь печени, алкогольная жировая болезнь печени, гипергликемия, стеатоз печени, дислипидемия, дисфункция иммунной системы, связанная с ожирением (увеличением веса), аллергия, астма, аутизм, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессия, другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, заживление ран, нарушения поведения, алкогольная зависимость, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, атеросклероз, синдром апноэ во сне, остеоартрит, болезнь желчного пузыря, рак и состояния, изменяющие физическую целостность слизистого барьера кишечника, такие как пищевые аллергии, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействие радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис и т.п.

Используемый термин "физиологически приемлемый носитель" или "приемлемый с пищевой точки зрения носитель" или "приемлемый с питательной точки зрения носитель" или "фармацевтически приемлемый носитель" относится к физиологически приемлемому или приемлемому с пищевой точки зрения или приемлемому с питательной точки зрения или фармацевтически приемлемому носителю, такому как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в обеспечении формы для введения полипептида или клетки-хозяина согласно изобретению. Каждый носитель должен являться "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и безвредности для субъекта, т.е. применимым для употребления или приемлемым с пищевой точки зрения. Термин "применимый для употребления" или "приемлемый с пищевой точки зрения" относится к ингредиентам или веществам, которые обычно считаются безопасными для употребления человеком (а также другими млекопитающими). Неограничивающие примеры материалов, которые могут служить физиологически приемлемыми носителями или приемлемыми с питательной точки зрения или фармацевтически приемлемыми носителями, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошковый трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и воски суппозиторий; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновая кислота; (16) апирогенная вода; (17) изотонический физиологический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; (21) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических композициях, и т.п. Кроме того, используемые термины "приемлемый с питательной точки зрения" и "фармацевтически приемлемый" относятся к тем композициям или сочетаниям веществ, материалов или композиций и/или их лекарственным формам,

которые отвечают здравому медицинскому суждению, применимы для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, и соответствуют разумному соотношению между выгодой и риском.

Термин "гомеостаз" относится к свойству системы, переменные которой регулируются таким образом, что внутренние условия остаются стабильными и относительно постоянными. У всех животных регулируется содержание глюкозы в крови. Регулирование содержания глюкозы в организме является процессом поддержания "глюкозного гомеостаза" в организме. Содержание глюкозы в крови у млекопитающего регулируют различные гормоны (например, инсулин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид 1, катехоламин и многие другие) и различные нервные пути (например, транслятор нервных импульсов, ось кишечник - мозг - периферийные органы). Содержание глюкозы в организме человека поддерживается постоянным в течение большей части суток даже после 24-часового голодания. Содержание глюкозы лишь незначительно снижается даже в течение длительных периодов голодания. Инсулин, секретируемый бета-клетками поджелудочной железы, эффективно переносит глюкозу в клетки организма, отдавая этим клетки команды сохранять больше глюкозы для собственного использования. Если содержание глюкозы внутри клеток является высоким, клетки будут превращать ее в нерастворимый гликоген, чтобы предотвращать помехи для клеточного метаболизма со стороны растворимой глюкозы. В конечном итоге это снижает содержание глюкозы в крови, а инсулин помогает предотвращать гипергликемию. В случае дефицита инсулина или резистентности клеток к инсулину возникает диабет. Глюкагон, секретируемый альфа-клетками поджелудочной железы, побуждает клетки разрушать накопленный гликоген или превращать безуглеводные источники углерода в глюкозу посредством глюконеогенеза и тем самым предотвращать гипогликемию. В контроле глюкозного обмена участвуют многочисленные другие факторы и гормоны (например, глюкагоноподобный пептид 1, катехоламин и многие другие). Этому сложному регулированию также способствуют различные механизмы, связанные с нервными путями.

"Холестериновый гомеостаз" - это механизм, который способствует процессу поддержания сбалансированного внутреннего состояния холестерина в живом организме. Холестерин, являющийся одной из важных биологических молекул в организме человека, выполняет различные физиологические функции, такие функция предшественника синтеза желчных кислот, витамина D и стероидных гормонов. Он также является одним из важных структурных элементов мембраны каждой клетки, присутствующей в организме. Несмотря на полезные и необходимые функции холестерина, нарушение холестеринового гомеостаза может вызывать повышенный риск сердечных заболеваний, а также нарушать другие системы гомеостатической обратной связи, связанные с холестериновым обменом. Наиболее очевидным органом, который регулирует холестериновый гомеостаз, является печень, поскольку она не только отвечает за биосинтез холестерина, который высвобождается в систему кровообращения, но и разрушает потенциально опасный, несвязанный холестерин из кровотока. Для поддержания холестеринового гомеостаза полезны липопротеины высокой плотности (ЛПВП), поскольку они захватывают и возвращают потенциально опасный холестерин непосредственно в печень, где он синтезируется в безопасные желчные кислоты, используемые системой пищеварения. ЛПНП менее полезны, поскольку они имеют тенденцию накапливать свой холестерин в клетках организма и на артериальных стенках. Доказано, что именно чрезмерный уровень ЛПНП, повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний. У здоровых субъектов холестериновый гомеостаз жестко регулируется сложными контурами обратной связи. В этом случае, если здоровый субъект потребляет обильные количества пищевого холестерина, в печени значительно уменьшается биосинтез, чтобы поддерживать равновесие. У здорового субъекта с высоким исходным уровнем ЛПНП вследствие многолетних нездоровых пищевых привычек или других генетических или медицинских состояний контур обратной связи и системный механизм приспособления могут подавляться этим же обильным потреблением, что вызывает опасный гомеостатический дисбаланс.

"Триглицеридный гомеостаз" - это механизм, который способствует процессу поддержания сбалансированного внутреннего состояния триглицеридов в живом организме. Триглицеридный обмен играет важную клиническую роль. Гипертриглицеридемия означает высокое содержание в крови или сыворотке триглицеридов, наиболее распространенных молекул жирных кислот. Повышенное содержание триглицеридов связано с атеросклерозом даже при отсутствии гиперхолестеринемии (высокого содержания холестерина) и предрасполагают к сердечнососудистым заболеваниям. Высокое содержание триглицеридов также повышает риск острого панкреатита. Кроме того, рост содержания триглицеридов со временем повышает риск развития диабета. Доказано, что резистентность к инсулину связана с высоким содержанием триглицеридов (ТГ).

Используемый термин "около" обозначает интервалы стандартного допуска в технике, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. Термин "около" может пониматься как охватывающий значения, которые отклоняются не более, чем на 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 или 0,01% от указанного значения.

Используемые термины "содержащий" или "содержать" и их производные формы относятся к ситуации, в которой упомянутые термины используются в их неограничивающем смысле, чтобы указать, что все следующее за ними включено, а конкретно не указанное не исключено. Он также охватывает имеющие более ограничивающий смысл термины "состоять преимущественно из" и "состоять из".

Упоминание какого-либо элемента в единственном числе не исключает возможности наличия нескольких элементов, если контекстом явно не требуется наличие одного и только одного из элементов. Таким образом, форма единственного числа обычно означает "по крайней мере один".

Подробное описание изобретения

Авторами изобретения обнаружено, что полипептид Amuc-1100 или его варианты согласно изобретению способны модулировать и/или стимулировать функцию иммунной системы кишечника и/или поддерживать и/или восстанавливать и/или повышать физическую целостность слизистого барьера кишечника и/или поддерживать и/или восстанавливать и/или улучшать глюкозный и/или холестеринный и/или триглицеридный гомеостаз у млекопитающего (например, человека). Авторами изобретения также обнаружено, что этот полипептид присутствует вне клеток, кодируемых бактериями *Akkermansia muciniphila*, что подтверждает его роль в передаче сигналов.

Авторы изобретения полагают, что такие благоприятные эффекты являются следствием способности полипептидов согласно изобретению взаимодействовать с сигнальным путем TLR2, присутствующим на поверхности иммунных клеток, находящихся вблизи слизистого барьера кишечника млекопитающего. Более конкретно, авторами настоящего изобретения обнаружено, что описанные в описании полипептиды способны взаимодействовать с TLR2, присутствующим на поверхности иммунной клетки, и/или модулировать и/или стимулировать сигнальный путь TLR2 в иммунной клетке, находящейся вблизи слизистого барьера кишечника, таким образом, чтобы стимулировать секрецию цитокинов (например, IL-6, IL-8 и IL-10) из упомянутых иммунных клеток.

Кроме того, авторами настоящего изобретения обнаружено, что полипептиды, включая их варианты согласно изобретению, способны модулировать и/или повышать трансэпителиальную резистентность слизистого барьера кишечника млекопитающего. Поскольку повышенная трансэпителиальная резистентность служит показателем сниженной проницаемости слизистого барьера кишечника, предполагается, что полипептиды, включая их варианты согласно изобретению, способны регулировать физическую целостность слизистого барьера кишечника, в частности, на уровне плотных соединений между эпителиальными клетками.

Предполагается, что все это в сочетании приводит к улучшению или усилению функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника (например, к большему высвобождению цитокинов на слизистом барьере кишечника), а также к улучшению или повышению физической целостности слизистого барьера кишечника, в частности, на уровне связи между эпителиальными клетками кишечника (т.е. за счет более плотных соединений между клетками).

Кроме того, обнаружено, что лечение мышей, получавших рацион с высоким содержанием жира (HFD), с помощью Amuc-1100, вызывало заметное снижение массы тела и увеличение массы жира без оказания влияния на потребление пищи. Лечение с помощью Amuc-1100 также корректировало индуцированную HFD гиперхолестеринемия со значительным снижением содержания холестерина ЛПВП в сыворотке и аналогичную тенденцию в отношении холестерина ЛПНП. Кроме того, введение Amuc-1100 снижало непереносимость глюкозы в такой же мере, как в случае живых бактерий *Akkermansia muciniphila*.

Наконец, поскольку известно, что метформин стимулирует рост *Akkermansia* (Lee H и Ko G, *Appl Environ Microbiol.* 2014 Oct, 80 (19): 5935-43), следовательно, вероятно, что *Akkermansia* и ее внеклеточные пептиды, такие как Amuc-1100, могут оказывать воздействие, сходное с воздействием метформина на гестационный диабет и преэклампсию (Syngelaki и др., *N Engl J Med.* 2016 Feb 4, 374 (5): 434-43).

Полипептиды.

В настоящем изобретении предложен выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способный осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника и/или на глюкозный и/или холестеринный гомеостаз. Описанный полипептид может быть способным связывать toll-подобный рецептор 2 (TLR2).

В одном из вариантов осуществления полипептиды и их варианты согласно изобретению способны стимулировать сигнальный путь TLR2 в клетке, стимулировать высвобождение цитокинов из клетки (например, IL-6, IL-8, IL-10 и т.п.) и/или повышать трансэпителиальную резистентность (ТЭР) млекопитающего, например человека, и/или улучшать метаболический или иммунный статус млекопитающего, например, мыши или человека.

Полипептид согласно изобретению также может именоваться "белком Amuc-1100" или "полипептидом Amuc-1100". Следует понимать, что термин "белок Amuc-1100" или "полипептид Amuc-1100" или "полипептид согласно изобретению" также включает варианты белка Amuc-1100, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотные последовательности упомянутых вариантов более чем на 50%, предпочтительно более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, предпочтительно более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90%, более чем на 95%, предпочтительно более чем на 96%, предпочтительно более чем на 97%, предпочтительно более чем на 98% и предпочтительно более чем на 99% идентичны аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 1. Варианты полипептида Armuc-1100, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, также включают полипептиды, которые путем замены, делеции или вставки одной или нескольких аминокислот получены из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Такие полипептиды предпочтительно содержат от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более до 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 замен, делеций или вставок аминокислот по сравнению с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Полипептиду согласно изобретению может предшествовать N-концевая сигнальная последовательность, стимулирующая секрецию полипептида из клетки. В одном из вариантов осуществления N-концевой сигнальной последовательностью может являться полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, которая представляет собой предсказанную природную N-концевую сигнальную последовательность полипептида Armuc-1100. Однако также могут использоваться другие N-концевые сигнальные последовательности, способные обеспечивать секрецию Armuc-1100 из клетки. Например, может использоваться усеченная версия или расширенная версия предсказанной природной N-концевой сигнальной последовательности N-полипептида Amuc-1100 при условии, что такая N-концевая сигнальная последовательность может обеспечивать секрецию Amuc-1100 из клетки. В качестве альтернативы, может использоваться не встречающаяся в природе N-концевая сигнальная последовательность. Специалист в данной области техники способен идентифицировать N-концевые сигнальные последовательности, применимые в настоящем изобретении. Таким образом, полипептид согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 на N-конце своей аминокислотной последовательности.

Для определения идентичности аминокислотной последовательности могут использоваться любые применимые средства, доступные из техники. Например, идентичность аминокислотной последовательности может определяться путем парного выравнивания с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша и параметров GAP по умолчанию, как описано выше. Также подразумевается, что для идентификации, синтеза или выделения вариантов полипептидов согласно изобретению могут использоваться многие способы, такие как вестерн-блоттинг, иммуногистохимия, ELISA, синтез аминокислот и т.п.

Также подразумевается, что любые варианты полипептидов Amuc-1100 согласно изобретению проявляют такую же функцию и/или обладают такой же активностью, как и полипептид Amuc-1100 согласно изобретению. Функциональные возможности или активность любых полипептидов Amuc-1100 или их вариантов может определяться любыми известными из техники способами, которые специалист счел бы применимыми в этих целях.

Полинуклеотиды.

В настоящем изобретении также предложена молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула выделенной, синтетической или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновых кислот, выбранную из группы, включающей:

(а) последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и

(б) последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид согласно изобретению.

Термин "молекула выделенной нуклеиновой кислоты" (например, кДНК, геномной ДНК или РНК) включает молекулы природных, искусственных или синтетических нуклеиновых кислот. Молекулы нуклеиновой кислоты могут кодировать любой из полипептидов согласно изобретению. Молекула нуклеиновой кислоты может использоваться для получения полипептидов согласно изобретению. Вследствие вырожденности генетического кода молекулы различных нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же полипептид (например, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1).

В одном из вариантов осуществления молекулы выделенных нуклеиновых кислот согласно изобретению включают молекулы любых вариантов нуклеиновых кислот, в число которых входят молекулы любых нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидную последовательность, более чем на 50%, предпочтительно более чем на 55%, предпочтительно более чем на 60%, предпочтительно более чем на 65%, предпочтительно более чем на 70%, предпочтительно более чем на 75%, предпочтительно более чем на 80%, предпочтительно более чем на 85%, предпочтительно более чем на 90%, предпочтительно более чем на 95%, предпочтительно более чем на 96%, предпочтительно более чем на 97%, предпочтительно более чем на 98%, и предпочтительно более чем на 99% идентичную нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2. Варианты также включают молекулы нуклеиновых кислот, которые путем замещения, делеции или вставки одной или нескольких нуклеиновых кислот получены из молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2. Такие молекулы нуклеиновых кислот предпочтительно содержат от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более до 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 замещений, делеций или вставок нуклеиновых кислот по сравнению с SEQ ID NO: 2.

Для определения идентичности последовательности могут использоваться любые применимые средства, доступные из техники. Например, может использоваться биоинформатика для осуществления парного выравнивания нуклеотидных последовательностей с целью идентификации областей сходства, которые могут быть обусловлены функциональными, структурными или эволюционными взаимосвязями

между последовательностями. Также подразумевается, что для идентификации, синтеза или выделения вариантов полинуклеотида согласно изобретению, могут использоваться многие способы, такие как гибридизация нуклеиновых кислот, технология ПЦР, компьютерное моделирование, синтез нуклеиновых кислот и т.п.

Кроме того, подразумевается, что любая молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению может кодировать полипептид согласно изобретению.

В одном варианте осуществления молекулой нуклеиновой кислоты является молекула нуклеиновой кислоты, имеющая последовательность нуклеиновых кислот, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В качестве альтернативы, молекулой выделенной нуклеиновой кислоты может являться молекула нуклеиновой кислоты, которая создает гибрид в строгих условиях с молекулами нуклеиновых кислот согласно изобретению и кодирует полипептид согласно изобретению. Например, такая последовательность нуклеиновых кислот может преимущественно использоваться при скрининге в целях обнаружения присутствия или отсутствия каких-либо гомологов молекул нуклеиновых кислот согласно изобретению в клетке или в организме или обнаружения уменьшения или увеличения экспрессии молекул нуклеиновых кислот согласно изобретению в клетке или в организме.

Молекулой нуклеиновой кислоты согласно изобретению может являться молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая N-концевую сигнальную последовательность, применимую для стимулирования секреции полипептида согласно изобретению из его клетки-хозяина. Кодирующая N-концевую сигнальную последовательность молекула нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновых кислот, приведенную в SEQ ID NO: 4.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению может быть включена в химерный ген, в котором она оперативно связана с промотором. Таким образом, настоящее изобретение также относится к химерному гену, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению.

Могут использоваться любые промоторы, известные из техники и применимые для связывания молекул нуклеиновых кислот согласно изобретению. Неограничивающие примеры применимых промоторов включают промоторы, допускающие конститутивную или регулируемую экспрессию, слабую и сильную экспрессию и т.п. Для включения молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению в химерный ген могут использоваться любые известные из техники способы.

Может быть выгодным оперативно связывать молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению с так называемым "конститутивным промотором".

В качестве альтернативы, может быть выгодным оперативно связывать полинуклеотиды и их варианты согласно изобретению с так называемым "индуцибельным промотором". Индуцибельным промотором может являться промотор, который регулируется физиологически (например, путем наружного нанесения определенных соединений).

Химерный ген согласно изобретению может содержаться в "векторе" или "конструкции нуклеиновой кислоты". Таким образом, настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим химерный ген согласно изобретению или молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению.

Согласно одной из особенностей в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, генетически модифицированная таким образом, что в ее геноме содержится молекула нуклеиновой кислоты согласно изобретению, химерный ген согласно изобретению или вектор согласно изобретению.

Генетически модифицированная клетка-хозяин согласно изобретению может использоваться для получения *in vitro*, *ex vivo* и/или *in vitro* полипептидов и их вариантов согласно изобретению в цитоплазме клеток-хозяев или высвобожденных из клеток любыми способами. Полипептиды согласно изобретению могут, в частности, экспрессировать в виде растворимой или секретируемой молекулы. Генетически модифицированными клетками-хозяевами согласно изобретению могут являться любые клетки-хозяева, применимые для процедур трансформации или генной инженерии. Неограничивающие примеры применимых клеток-хозяев включают культивируемые клетки, такие как любые прокариотические или эукариотические клетки. В одном из вариантов осуществления полипептид AMUC-1100 экспрессирует в бактериях, таких как *Escherichia coli*.

В одном из вариантов осуществления клеткой-хозяином согласно изобретению может являться любая клетка, которая естественным образом экспрессирует полипептид или его варианты согласно изобретению. В таком случае клетка-хозяин может сверхэкспрессировать полипептид или его варианты согласно изобретению.

В еще одном варианте осуществления клеткой-хозяином согласно изобретению может являться любая клетка, которая естественным образом не экспрессирует полипептид или его варианты согласно изобретению.

В варианте осуществления клетка-хозяин согласно изобретению не относится к виду *Akkermansia muciniphila*.

В другом варианте осуществления клетка-хозяин может относиться к виду *Akkermansia muciniphila*, при этом она генетически модифицирована таким образом, что содержит дополнительные копии молекул нуклеиновых кислот согласно изобретению или химерный ген или вектор согласно изобретению.

Такая клетка *Akkermansia muciniphila* может сверхэкспрессировать полипептид Амус-1100 или его вариант согласно изобретению.

Клетка-хозяин согласно изобретению может быть генетически модифицирована любыми известными из техники способами. Например, клетки-хозяева или организмы согласно изобретению могут быть генетически модифицированы способом, включающим стадии:

а) трансформации клетки-хозяина молекулой нуклеиновой кислоты согласно изобретению, например, молекулой выделенной, синтетической или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновых кислот, выбранную из группы последовательностей нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 50% идентичных по всей длине последовательности с SEQ ID NO: 2; и последовательность нуклеиновых кислот, способную кодировать полипептиды и их варианты согласно изобретению;

б) культивирования упомянутой клетки-хозяина в условиях, применимых для обеспечения экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению и/или получения полипептида или его варианта согласно изобретению;

в) обязательно скрининга клеток-хозяев, способных экспрессировать молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению и/или продуцировать полипептид или его вариант согласно изобретению.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления клетки-хозяева или организмы согласно изобретению могут трансформироваться молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, или ее вариантом согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированная клетка-хозяин согласно изобретению может принадлежать к бактериям вида, который встречается в природе или живет вблизи или внутри слизистого барьера кишечника млекопитающего. Бактерии упомянутого вида часто именуется "бактериями слизистой оболочки кишечника". Неограничивающие примеры "бактерий слизистой оболочки кишечника", включают *Akkermansia muciniphila* (ATTC BAA-835), *Faecalibacterium prausnitzii* (A2-165), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) и *Bifidobacterium breve* (DSM-20213).

В некоторых вариантах осуществления может быть выгодным генетически модифицировать бактерии слизистой оболочки кишечника любым из полинуклеотидов и их вариантов согласно изобретению, например, с целью экспрессии или сверхэкспрессии полинуклеотидов согласно изобретению или продуцирования или сверхпродуцирования полипептидов согласно изобретению непосредственно вблизи или внутри слизистого барьера кишечника млекопитающего (например, человека). В одном из предпочтительных вариантов осуществления бактериями слизистой оболочки кишечника могут являться любые бактерии вида *Akkermansia muciniphila*. Такое сверхпродуцирование может достигаться методами генетической модификации с использованием технологий рекомбинантных ДНК, редактирования генома, такого как путем использования инструментов на основе систем типа CRISPR/cas, или посредством классических систем выбора мутаций.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированной клеткой-хозяином могут являться любые бактерии, в частности, не относящиеся к бактериям того вида, который встречается в природе или живет вблизи или внутри слизистой оболочки кишечника млекопитающего. Неограничивающие примеры таких бактерий включают штаммы, выделенные из любых полезных кишечных бактерий, например, могут использоваться пробиотические бактерии, в частности штаммы бактерий, выбранных из родов *Lactococcus*, *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*. Кроме того, могут использоваться строго анаэробные кишечные бактерии, такие как бактерии, относящиеся к родам, которые, как известно, встречаются в кишечном тракте человека (Rajilic-Stojanovic & de Vos, The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. FEMS Microbiol Rev. 38:996-1047).

Способы получения полипептида.

Согласно одной из дополнительных особенностей настоящего изобретения предложен способ получения полипептидов, в том числе их вариантов согласно изобретению, включающий стадии:

(а) культивирования клетки-хозяина согласно изобретению в условиях, обеспечивающих получение полипептида или его варианта согласно изобретению; и

(б) необязательно выделения полипептида, полученного на стадии (а).

На стадии (а) клетка-хозяин согласно изобретению может культивироваться любыми известными способами и в любой известной культуральной среде. Специалист в данной области сможет выбрать применимую клетку-хозяина и применимые условия, позволяющие получать полипептид.

В качестве альтернативы, полипептид может быть получен способом, включающим стадии:

(а) культивирования бактерий вида *Akkermansia muciniphila* в применимой культуральной среде; и

(б) необязательно, выделения полипептида, полученного на стадии (а).

Полипептид, полученный на стадиях (а) упомянутых способов, может быть выделен любыми известными из техники способами. Специалист в данной области способен выделить полипептид, полученный из такой культуральной среды.

Применимые культуральные среды, например, описаны Derrien и др. (2004, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1469-76). Как описано у Derrien и др., выделили штамм Muc^T *Muciniphila* и вырастили его в базальной анаэробной среде, содержащей муцин желудочной слизи свиньи в качестве единственного ис-

точника углерода и азота. Авторы также пишут, что *A. muciniphila* могут выращиваться в жирных средах, таких как колумбийский бульон (от английского - Columbia Broth (CB)) и бульон с сердечно-мозговым экстрактом (от английского - Brain Heart Infusion (BHI)) или в базальной среде с глюкозой и высоким содержанием казитонов и дрожжевых экстрактов. Аналогичным образом, у Lukovac и др. описано выращивание *A. muciniphila* в базальной среде, содержащей глюкозу и фукозу, а также большие количества казитонов (2014, mBio 01438-14)

Способы скрининга бактерий.

Согласно одной из дополнительных особенностей настоящего изобретения предложен способ обнаружения присутствия или отсутствия в бактериях полинуклеотида согласно изобретению, включающий стадии:

(а) использования молекулы нуклеиновой кислоты, которая создавать гибрид в строгих условиях с молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2 или последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине последовательности нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2;

(б) обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты, использованной на стадии (а), с целью идентификации бактерий, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2 или последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 50% идентичную по всей длине последовательности нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 2.

В настоящем изобретении также предложен способ обнаружения присутствия или отсутствия в бактериях полипептида или его вариантов согласно изобретению, включающий стадии:

(а) использования антитела, которое способно связывать полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(б) обнаружение антитела, используемого на стадии (а), с целью идентификации бактерий, содержащих полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов осуществления для облегчения обнаружения нуклеиновая кислота, используемая на стадии (а), и/или антитело, используемое на стадии (а), помечены (например, флуоресцентными, радиоактивными метками и т.д.).

Композиции.

Согласно одной из дополнительных особенностей настоящего изобретения предложена композиция, содержащая любой из полипептидов согласно изобретению. В одном из предпочтительных вариантов осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Согласно еще одной из дополнительных особенностей настоящего изобретения предложена композиция, содержащая клетку-хозяина согласно изобретению. Клетка-хозяин может присутствовать в количестве от около 10^4 до около 10^{15} колониеобразующих единиц (КОЕ). Например, эффективное количество клетки-хозяина может составлять от около 10^5 КОЕ до около 10^{14} КОЕ, предпочтительно от около 10^5 КОЕ до около 10^{13} КОЕ, предпочтительно от около 10^7 КОЕ до около 10^{12} КОЕ, более предпочтительно от около 10^8 КОЕ до около 10^{12} КОЕ. Клетка-хозяин может являться жизнеспособной или мертвой. Эффективность клетки-хозяина находится в определенном соотношении с присутствием полипептида согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления композиция согласно изобретению дополнительно содержит носитель, например, физиологически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый носитель или приемлемый с пищевой точки зрения носитель или приемлемый с питательной точки зрения носитель. Носителем может являться любой инертный носитель. Например, неограничивающие примеры применимых физиологически или фармацевтически приемлемых носителей включают любые из известных физиологических или фармацевтических носителей, буферов, разбавителей и эксципиентов. Следует учесть, что выбор применимого физиологического или фармацевтического носителя или пищевого носителя или питательного носителя будет зависеть от предполагаемого способа введения композиции согласно изобретению (например, перорально) и предполагаемой формы композиции (например, напиток, йогурт, порошок, капсула и т.п.). Специалистам известно, как выбрать соответствующий носитель, например физиологически приемлемый носитель, или приемлемый с питательной точки зрения носитель, или фармацевтически приемлемый носитель, который применим в композициях согласно изобретению или совместим с ними.

В одном из вариантов осуществления композиции согласно изобретению могут представлять собой питательную или пищевую композицию. Например, композицией согласно изобретению может являться пищевой продукт, пищевая добавка, корм или кормовая добавка, такая как молочный продукт, например ферментированный молочный продукт, такой как йогурт или питьевой йогурт. В этом случае композиция может содержать приемлемый с питательной или пищевой точки зрения носитель, который может представлять собой применимую пищевую основу.

В одном из вариантов осуществления композиции согласно изобретению могут представлять собой

фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция также может использоваться в качестве добавки (например, пищевой добавки). Фармацевтическая композиция согласно изобретению может содержать фармацевтически приемлемый, приемлемый с питательной или пищевой точки зрения или физиологически приемлемый носитель помимо полипептида согласно изобретению и/или клеткам-хозяевам согласно изобретению. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и (терапевтического) применения. Носителем могут являться любые совместимые, физиологически приемлемые нетоксичные вещества, применимые для доставки полипептида согласно изобретению, и/или клетки-хозяина согласно изобретению до желудочно-кишечного тракта млекопитающего (например, человека), предпочтительно до области вблизи или внутри слизистого барьера кишечника (более предпочтительно слизистого барьера толстой кишки) млекопитающего. Например, в качестве носителя может использоваться стерильная вода или инертные твердые вещества, обычно дополняемые фармацевтически приемлемым адъювантом, буферным агентом, диспергатором и т.п.

Композиция согласно изобретению может находиться в жидкой форме, например в форме стабилизированной суспензии полипептида согласно изобретению или клетки-хозяина согласно изобретению или в твердой форме, например в форме порошка лиофилизированных клеток-хозяев согласно изобретению. Если клетки-хозяева согласно изобретению лиофилизированы, может использоваться криопротектор, такой как лактоза, трегалоза или гликоген.

В случае перорального введения полипептиды согласно изобретению или лиофилизированные клетки-хозяева согласно изобретению могут вводиться в виде твердых лекарственных форм, таких как капсулы, таблетки и порошки, или в виде жидких лекарственных форм, таких как эликсиры, сиропы и суспензии. Полипептид согласно изобретению или клетка-хозяин согласно изобретению может быть заключен в капсулы, такие как желатиновые капсулы, вместе с неактивными ингредиентами и порошковыми носителями, такими как, например, глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, крахмал, целлюлоза или производные целлюлозы, стеарат магния, стеариновая кислота, сахарин, тальк, карбонат магния и т.п.

В одном из вариантов осуществления композиции согласно изобретению могут содержать один или несколько ингредиентов, которые применимы для способствования выживаемости, и/или жизнеспособности, и/или поддержания полипептида согласно изобретению, и/или его целостности, и/или клетки-хозяина согласно изобретению, и/или ее целостности во время хранения, и/или во время воздействия желчи, и/или при прохождении через желудочно-кишечный тракт млекопитающего (например, человека). Неограничивающие примеры таких ингредиентов включают энтеросолюбильное покрытие и вещества с контролируемым высвобождением, обеспечивающие прохождение через желудок. Специалистам известно, как выбрать применимые ингредиенты для обеспечения того, чтобы действующий компонент (полипептид или клетка-хозяин) достиг своего заданного места назначения, в котором он осуществляет свое действие.

В одном из вариантов осуществления композиции согласно изобретению могут дополнительно содержать связывающий слизистый оболочку агент или связывающий слизистую оболочку полипептид. Используемый термин "связывающий слизистый оболочку агент" или "связывающий слизистый оболочку полипептид", относится к агенту или полипептиду, который способен сцепляться с поверхностью слизистой оболочки, образующей слизистый барьер кишечника млекопитающего (например, человека).

В качестве альтернативы, могут использоваться конкретные стыковочные системы для присоединения полипептида Amuc-1100 к продуцирующим Amuc-1100 клеткам или даже к не продуцирующим Amuc-1100 клеткам, которые являются живыми или мертвыми. Связывание может происходить на C-конце или N-конце в зависимости от того, где это представляется более эффективным, хотя также описано использование спейсерных пептидов. Примеры включают использование пептидогликановых систем связывания на основе LysM (Visweswaran GR и др., 2014, Appl Microbiol Biotechnol. 98: 4331-45). Кроме того, известны разнообразные связывающие слизистую оболочку полипептиды. Неограничивающие примеры связывающих слизистую оболочку полипептидов включают связывающие мембрану бактериального токсина субъединицы, такие как связывающая холерный токсин субъединица В, связывающая термолabileный энтеротоксин E. coli субъединица В, связывающие токсин Bordetella pertussis субъединицы S2, S3, S4 и/или S5, связывающий дифтерийный токсин фрагмент В и субъединицы, связывающие мембраны Шига-токсина или Шига-подобных токсинов. Другие применимые полипептиды, связывающие слизистую оболочку, включают белки фимбрий бактериальных клеток, таких как фимбрии E. coli K88, K99, 987P, F41, FAIL, CFAIII ICES1, CS2 и/или CS3, CFAIV ICS4, CS5 и/или CS6), P fimbriae и т.п. Другие неограничивающие примеры фимбрий включают нитевидный гемагглютинин Bommotella pertussis, токсинорегулируемые пили (TCP) холерного вибриона, чувствительный к маннозе гемагглютинин (MSHA), чувствительный к фукозе гемагглютинин (PSHA) и т.п. Другие связывающие слизистую оболочку агенты включают белки присоединения вирусов, в том числе гемагглютинины вируса гриппа и вируса Сендай, а также животные лектины или лектиноподобные молекулы, включая молекулы иммуноглобулина или их фрагменты, лектины кальций-зависимого типа (С-типа), селектины, коллектины или гемагглютинин винограднои улитки, растительные лектины со связывающими слизистую оболочку субъединицами, включающими конканавалин А, агглютинин зародышей пшеницы, фитогемагглютинин, абрин, рицин и т.п. Преимущество этого способа доставки заключается в том, что не используется живой рекомбинантный организм.

Хотя это и не является существенным, может оказаться целесообразным добавление в композицию согласно изобретению одного или нескольких связывающих слизистую оболочку агентов или связывающих слизистую оболочку полипептидов для нацеливания полипептида согласно изобретению или клетки-хозяина согласно изобретению на слизистый барьер кишечника.

Композиции согласно изобретению могут дополнительно содержать ингредиенты, выбранные из группы, включающей пребиотики, пробиотики, углеводы, полипептиды, липиды, витамины, минералы, лекарственные средства, консерванты, антибиотики или любое их сочетание.

В одном из вариантов осуществления композиция согласно изобретению может дополнительно содержать один или несколько ингредиентов, которые дополнительно повышают пищевую ценность и/или терапевтическую ценность композиций согласно изобретению. Например, может являться полезным добавление одного или нескольких ингредиентов (например, питательных ингредиентов, ветеринарных или лекарственных средств и т.д.), выбранных из белков, аминокислот, ферментов, минеральных солей, витаминов (например, тиамина гидрохлорида, рибофлавина, пиридоксина гидрохлорида, ниацина, инозитола, холинхлорида, пантотената кальция, биотина, фолиевой кислоты, аскорбиновой кислоты, витамина В12, р-аминобензойной кислоты, ацетата витамина А, витамина К, витамина D, витамина Е и т.п.), Сахаров и сложных углеводов (например, растворимых и нерастворимых в воде моносахаридов, дисахаридов и полисахаридов), лекарственных соединений (например, антибиотиков), антиоксидантов, микроэлементов (например, соединений кобальта, меди, марганца, железа, цинка, олова, никеля, хрома, молибдена, йода, хлора, кремния, ванадия, селена, кальция, магния, натрия, калий и т.п.). Специалистам известны методы и ингредиенты, применимые для повышения пищевой и/или терапевтической/медицинской ценности композиций согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин может быть включена в лиофилизированную форму или микрокапсулированную форму (рассмотренную, например, Solanki и др., BioMed Res. Int. 2013, Article ID 620719) или любую другую форму, сохраняющую активность и/или жизнеспособность клетки-хозяина (например, бактериальный штамм).

Способы лечения.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы лечения и/или предотвращения у млекопитающего нарушения или состояния, выбранного из группы, включающей ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или связанные с инсулином нарушения, диабета типа 2, диабета типа 1, гестационный диабет, преэклампсию, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертонию, сердечную патологию, инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени, алкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с ожирением (увеличением веса), аллергию, астму, аутизм, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессию, другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, заживление ран, нарушения поведения, алкогольную зависимость, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, атеросклероз, синдром апноэ во сне, остеоартрит, болезнь желчного пузыря, рак и состояния, изменяющие физическую целостность слизистого барьера кишечника, такие как пищевые аллергии, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействие радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис и т.п.; способы содействия снижению веса у млекопитающего; способы содействия противовоспалительной активности в кишечнике млекопитающего; способы стимулирования функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника млекопитающего; способы поддержания, восстановления и/или улучшения глюкозного и/или холестеринного и/или триглицеридного гомеостаза; и способы поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности слизистого барьера кишечника млекопитающего. Способы включают стадию введения нуждающемуся в этом млекопитающему эффективного количества полипептида согласно изобретению, клетки-хозяина согласно изобретению или композиции согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления полипептид согласно изобретению, клетка-хозяин согласно изобретению или композиция согласно изобретению могут вводиться любыми известными способами. Например, композиции согласно изобретению могут вводиться перорально, внутривенно, местно, энтерально или парентерально. Подразумевается, что способы или пути введения зависят от конкретного случая (например, возраста субъекта, желаемого местонахождения эффектов, болезненных состояний и т.п.), а также от предполагаемой формы композиции (например, таблетки, жидкость, порошок и т.д.).

В одном из предпочтительных вариантов осуществления полипептид согласно изобретению, клетку-хозяина согласно изобретению или композицию согласно изобретению вводят перорально.

Применение.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению, химерного гена согласно изобретению и/или векторов согласно изобретению для получения полипептидов согласно изобретению и/или генерирования клеток-хозяев согласно изобретению. Полипептид согласно изобретению и/или клетка-хозяин согласно изобретению

может обладать улучшенной способностью взаимодействовать с рецептором TLR2 в клетке и/или улучшенной способностью стимулировать сигнальный путь TLR2 в клетке и/или улучшенной способностью стимулировать продуцирование цитокинов из клетки, в частности IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 и TNF- α , и/или улучшенной способностью повышать ТЭР клеток млекопитающего, например, человека по сравнению с клеткой-хозяином (например, бактериями), генетически не модифицированной полинуклеотидами, химерными генами или векторами согласно изобретению.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен полипептид согласно изобретению, клетки-хозяева согласно изобретению или композиция согласно изобретению для применения в качестве лекарственного средства; в частности, для стимулирования функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника или для поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности слизистого барьера кишечника у млекопитающего; поддержания, восстановления и/или улучшения глюкозного и/или холестерина и/или триглицеридного гомеостаза у млекопитающего; предотвращения и/или лечения нарушения или состояния, выбранного из группы, включающей ожирение, такое как алиментарное ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или нарушения, связанные с инсулинорезистентностью, диабет типа 2, диабет 1 типа, гестационный диабет, преэклампсию, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертонию, сердечную патологию, инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени, алкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с ожирением (увеличением веса), аллергию, астму, аутизм, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессию, другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, заживление ран, нарушения поведения, алкогольную зависимость, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, атеросклероз, синдром апноэ во сне, остеоартрит, болезнь желчного пузыря, рак и состояния, изменяющие физическую целостность слизистого барьера кишечника, такие как пищевая аллергия, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействия радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис и т.п., у млекопитающего; для содействия противовоспалительной активности в кишечнике млекопитающего; или для содействия снижению веса у млекопитающего.

В одном из вариантов осуществления млекопитающее, например человек, может относиться к любой возрастной группе (например, младенцев, взрослых, пожилых людей) и любому полу (мужчины и женщины). В одном из вариантов осуществления млекопитающим может являться ребенок (например, новорожденный, младенец, ребенок, начинающий ходить, и т.д.), в частности недоношенный ребенок.

Млекопитающим может являться любое млекопитающее, например люди, приматы кроме человека, грызуны, кошки, собаки, коровы, лошади и т.п. В одном из предпочтительных вариантов осуществления млекопитающим является человек.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано, но не ограничено следующими примерами. Из приведенного выше описания и этих примеров специалист в данной области техники может выявить существенные характеристики настоящего изобретения и сможет, не выходя за пределы его идей и объема, внести в него различные изменения и модификации, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Следовательно, из приведенного выше описания специалистам в данной области будут очевидны различные модификации изобретения помимо тех, которые показаны и описаны в нем. Предполагается, что такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Чертеж демонстрирует:

- A) общее увеличение массы тела (г) (n=8-10);
- B) общий прирост массы жира (г), измеренный методом ЯМР спектроскопии с временным разрешением (n=8-10);
- C) суточное потребление пищи;
- D) уровни холестерина ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП в плазме (n=8-10);
- E) профиль содержания глюкозы в плазме (мг дл⁻¹);
- F) средняя площадь под кривой (AUC), измеренная в период между -30 мин и 120 мин после нагрузки глюкозой (мг. дл⁻¹; мин⁻¹; n=8-10);
- G) соотношение между контрольным и стимулированным инсулином p-IR β при контроле нагрузки, измеренное с методом денситометрии (n=3-5);
- H) и I) соотношения между контрольным и стимулированным инсулином p-Akt^{thr308} и p-Akt^{ser473} при контроле нагрузки, измеренные методом денситометрии (n=3-5).

Примеры

Пример 1. Размножение бактерий, генетически модифицированных с целью получения белков Атис-1100.

Способ.

Клонировали из полинуклеотида, кодирующего зрелый Атис-1100 (с нуклеотидной последователь-

ностью SEQ ID NO: 2), TOP10 *E. coli* с С-концевым His-Tag под контролем индуцибельного промотора T7 производных pET28 и ввели в *E. coli* BL23 (DE3) с целью сверхпродукции. Для этого добавили в нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 стартовый кодон ATG, чтобы полученный полипептид начинался с аминокислотной последовательности MIVNS. Все структуры были подтверждены путем анализа последовательностей методом Сэнгера. Структуры со сверхэкспрессией Amuc-1100 вызывали к сверхпродукции растворимых белков Amuc-1100, которые подвергали очистке до кажущейся гомогенности методом аффинной хроматографии на никелевой колонке и использовали в концентрации 100-300 мкг/мл. Очищенный Amuc-1100 использовали для размножения антител у кроликов, преимущественно, как описано ранее (Reunanen J и др., 2012, *Appl Environ Microbiol* 78: 2337-44).

Результаты.

Результаты показывают, что *E. coli*, трансформированные полинуклеотидом согласно изобретению (SEQ ID NO: 2), способна продуцировать белок Amuc-1100 в растворимой форме, который можно легко выделять методом на никелевой колонке, как описано у Tailford LE и др., 2015, *Nat Commun.* 6: 7624.

Пример 2. Взаимодействие и стимуляция сигнального пути TLR2.

Способ.

Подготовили линии репортерных клеток, экспрессирующих TLR2 и TLR4, чтобы испытать способность Amuc-1100 связывать TLR2 и другие TLR, а затем стимулировать сигнальные пути TLR2 и других TLR. Испытали *in vitro* способность Amuc-1100 связывать линии клеток, экспрессирующих TLR2 или TLR4, а затем стимулировать сигнальный путь TLR2 и/или TLR4 в упомянутых клетках путем измерения высвобождения NF-κB из репортерных клеток.

Вкратце, использовали линии клеток hTLR2 и hTLR4 (Invivogen, CA, USA). Стимуляция рецепторов соответствующими лигандами активирует NF-κB и AP-1, что индуцирует продуцирование секретрируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), уровни которой могут измеряться спектрофотометром (Spectramax). Все линии клеток выращивали и субкультивировали до 70-80% слияния с использованием в качестве поддерживающей среды в среде Дульбекко, модифицированной по способу Игла (DMEM), с добавлением 4,5 г/л D-глюкозы, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг стрептомицина, 100 мкг/мл нормоцина, 2 мМ L-глутамин и 10% по объему инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS). Для каждой линии клеток проводили эксперимент на иммунный ответ путем добавления 20 мкл суспензий Amuc-1100. Инкубировали репортерные клетки с Amuc-1100 в течение 20-24 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. В качестве положительного контроля использовали рецепторные лиганды Pam3CSK4 (10 нг/мл для hTLR2) и LPS-EB (50 нг/мл для hTLR4), а в качестве отрицательного контроля использовали поддерживающую среду без каких-либо избирательных антибиотиков. Определяли секрецию SEAP путем измерения OD600 через 15 мин, 1, 2 и 3 ч после добавления 180 мкл QUANTI-Blue (Invivogen, Калифорния, США) в 20 мкг индуцированного супернатанта hTLR2 и hTLR4. Эксперименты проводили трижды.

Результаты.

Результаты показывают, что Amuc-1100 способен взаимодействовать с TLR2. Кроме того, результаты показывают, что Amuc-1100 оказывает иммуностимулирующее действие на репортерные клетки, экспрессирующие TLR2, т.е. Amuc-1100 способен стимулировать высвобождение NF-κB из репортерных клеток.

Пример 3. Стимуляция выделения цитокинов из мононуклеарных клеток периферической крови.

Способ.

Испытали *in vitro* способность Amuc-1100 стимулировать продуцирование или высвобождение цитокинов из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Получили периферическую кровь трех здоровых доноров из банка крови Sanquin, Неймеген, Нидерланды. Отделили мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования Ficoll-Paque Plus в соответствии с протоколом производителя (Amersham biosciences, Упсала, Швеция). После центрифугирования собрали мононуклеарные клетки, промыли в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков (IMDM)+глутамакс (Invitrogen, Бреда, Нидерланды) и довели концентрацию до $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в IMDM+глутамакс с добавлением пенициллина (100 ед/мл) (Invitrogen), стрептомицина (100 г/мл) (Invitrogen) и 10% инактивированной нагреванием FBS (Lonza, Базель, Швейцария). Высеяли PBMC ($0,5 \times 10^6$ клеток на лунку) на 48-луночные планшеты для культивирования тканей. Для каждого донора использовался отрицательный контроль (только среда).

Стимулировали PBMC живыми или нагретыми в течение 10 мин до 99°C клетками *A. muciniphila* (в соотношении 1:10 к PBMC) или Amuc-1100 в течение 1 дня, а затем измерили продуцирование цитокинов IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, IL-1β и IL-12p70 в супернатантах культур методом множественного анализа (набор CBA для воспалительных цитокинов человека производства компании Becton, Dickinson) в соответствии с протоколом изготовителя на Cantoll FACS (производства компании Becton Dickinson) и проанализировали с использованием программного обеспечения BD FACS (производства компании Becton Dickinson). Согласно указаниям изготовителя были установлены следующие пределы обнаружения: 3,6 пг/мл IL-8, 7,2 пг/мл IL-1β, 2,5 мкг/мл IL-6, 3,3 пг/мл IL-10, 3,7 пг/мл TNF-α, 1,9 пг/мл IL-12p70.

Результаты.

Результаты показывают, что по сравнению с контролем (только средой) Amuc-1100 способен стимулировать продуцирование цитокинов, т.е. наблюдалось повышение уровней IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 и TNF- α . Уровень цитокинов, индуцированный 4,5 мкг/мл Amuc-1100, соответствовал его уровню в 5×10^6 живых или убитых нагреванием клетках *A. muciniphila* (см. таблицу).

Уровни цитокинов, индуцированные Amuc-1100

Цитокин (пг/мл)	Живые клетки <i>A. muciniphila</i>	Убитые нагреванием клетки <i>A. muciniphila</i>	Amuc-1100 (4,5 мкг/мл)
IL-1 β	894 \pm 298	392 \pm 71	504 \pm 227
IL-6	18029 \pm 309	13477 \pm 2014	12508 \pm 2362
IL-8	60018 \pm 18229	54230 \pm 9030	45432 \pm 12507
IL-10	823 \pm 310	638 \pm 118	526 \pm 180
TNF- α	1920 \pm 349	957 \pm 568	1317 \pm 885
IL-12p70	<2	<2	<2

и живыми или убитыми нагреванием клетками *Akkermansia muciniphila*

Пример 4. Модулирование трансэпителиальной резистентности (ТЭР).

Способ.

Оценили способность Amuc-1100 повышать целостность слоя эпителиальных клеток кишечника путем измерения способности Amuc-1100 стимулировать или увеличивать ТЭР клеток Caco-2 *in vitro*. Вкратце, высеяли клетки Caco-2 (по 5×10^4 клеток на вставку) на вставки Millicell в планшеты для клеточных культур (размер пор 3 мкм, Millipore) и выращивали в течение 8 дней. Однократно промыли бактериальные клетки RPMI 1640 и нанесли на вставки с измеренной на волне длиной 600 нм оптической плотностью 0,25 (приблизительно 10^8 клеток) в RPMI 1640. Нанесли очищенный Amuc-1100 на вставки в концентрациях 0,05, 0,5 и 5 мкг/мл. Определили трансэпителиальную резистентность клеточных культур с помощью счетчика ТЭР Millicell ERS-2 (Millipore) через 0 и 24 ч после добавления Amuc-1100.

Результаты.

Результаты показали, что уже в концентрации 0,05 мкг/мл через 24 ч совместного культивирования с клетками Caco-2 Amuc-1100 способен значительно увеличить ТЭР в такой же степени, как примерно 10^8 клеток *A. muciniphila*.

Пример 5. Модулирование алиментарной метаболической дисфункции.

Группа 10-11 недельных мышей линии C57BL/6J (n=10 на подгруппу) получала контрольный рацион (ND) или рацион с высоким содержанием жира (HFD; 60% жира и 20% углеводов (ккал/100 г) D12492i, Research Diet, Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США), как ранее описано Everard и др. (2013, PNAS, том 110(22): 9066-9071). Вырастили *A. muciniphila* Muc^T в синтетической среде (содержащей 0,4 г KH_2PO_4 , 0,669 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 г NH_4Cl , 0,3 г NaCl , 0,1 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 г казитола, 1 мМ L-треонина, 1 мл минерального раствора, 5 мМ L-фруктозы и 5 мМ D-глюкозы на литр деионизированной воды), как описано Lucovas и др. (2014, mBio 01438-14) и концентрировали, составили смесь в PBS, содержащем 25% глицерина, и хранили при температуре -80°C, как описано Everard и др. выше. Подгруппе мышей, получавших HFD, дополнительно ежедневно вводили через желудочный зонд 2×10^8 КОЕ/0,15 мл *A. muciniphila*, суспендированных в стерильном анаэробном PBS (HFD Akk), и, поскольку это предусматривало 10-кратное разведение *A. muciniphila*, полученная конечная концентрация глицерина составила 2,5%. Группы, получавшие ND и HFD, ежедневно вводили через желудочный зонд эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS, содержащего 2,5% глицерина, как ранее описано Everard и др. выше. Еще одна подгруппа мышей, получавших HFD, дополнительно получала пептид Amuc-1100 путем ежедневного введения через желудочный зонд 3,1 мкг белка Amuc-1100 в эквивалентном объеме стерильного PBS, содержащего 2,5% глицерина. Лечение мышей, получавших HFD, с помощью Amuc-1100, вызвало аналогичное или даже более заметное снижение массы тела и увеличение массы жира по сравнению с живой бактерией *A. muciniphila* (фиг. А и В) без влияния на потребление пищи (фиг. С). Лечение *A. muciniphila* или Amuc-1100 также корректировало индуцированную HFD гиперхолестеринемию со значительным снижением холестерина ЛПВП в сыворотке при аналогичной тенденции в отношении холестерина ЛПНП (фиг. D).

Примечательно, что лечение с помощью Amuc-1100 привело к значительному снижению уровня триглицеридов в сыворотке по сравнению с получавшими HFD нелеченными мышами. Кроме того, лечение Amuc-1100 также уменьшало средний диаметр адипоцитов с 38 мкм у получавших HFD мышей до 29 мкм, что сходно с их диаметром у нелеченных мышей (27 мкм).

Интересно, что Amuc-1100 вызывал непереносимость глюкозы в такой же степени, как и живая бактерия (фиг. E-F).

С целью дальнейшего изучения метаболизма глюкозы авторы исследовали чувствительность к инсулину путем инъекции инсулина в портальную вену. Было проанализировано индуцированное инсули-

ном фосфорилирование рецептора инсулина (IR) и его находящегося ниже по потоку медиатора Akt в печени на участках треонина (Akt^{thr}) и серина (Akt^{ser}) (фиг. G). HFD приводил к уменьшению фосфорилирования всех белков по сравнению с мышами, которые получали контрольный рацион, которое достигало значимости в случае Akt^{thr} (фиг. H). Лечение живыми *A. muciniphila* или Amuc-1100 противодействовало этим эффектам, при этом у мышей, которых лечили Amuc-1100 (фиг. G-H), наблюдались значительно более высокие уровни p-IR и p-Akt^{thr}, а у мышей, которых лечили живой бактерией (фиг. I), наблюдались значительно более высокие уровни p-Akt^{ser} по сравнению с нелечеными мышами, получавшими HFD.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для влияния на иммунную сигнализацию и/или на барьерную функцию кишечника, и/или модулирования метаболического статуса, содержащая выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способный осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, и фармацевтически приемлемый или приемлемый с пищевой точки зрения носитель.

2. Композиция по п.1, которая является пищевой композицией или фармацевтической композицией.

3. Генетически модифицированная клетка-хозяин, в геном которой введена молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, включающей:

(а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; и

(б) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, при этом упомянутый полипептид способен осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз.

4. Генетически модифицированная клетка-хозяин, не относящаяся к виду *Akkermansia muciniphilla* и содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, включающей:

(а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине последовательности SEQ ID NO: 2; и

(б) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, при этом упомянутый полипептид способен осуществлять иммунную сигнализацию, и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз.

5. Генетически модифицированная клетка-хозяин, относящаяся к виду *Akkermansia muciniphilla*, в геном которой введена молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, включающей:

(а) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновых кислот, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине последовательности SEQ ID NO: 2; и

(б) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновых кислот, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, при этом упомянутый полипептид способен осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз.

6. Способ получения полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, при этом способ включает стадии:

а) культивирования клетки-хозяина по любому из пп.3-5 в условиях, позволяющих получать упомянутый полипептид; и

б) выделения полипептида, полученного на стадии (а).

7. Применение полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, в качестве лекарственного средства для осуществления иммунной сигнализации и/или влияния на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз.

8. Применение полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, для стимулирования функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника, для поддержания, восстановления и/или улучшения глюкозного, и/или холестеринного, и/или триглицеридного гомеостаза, или для поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности слизистого барьера кишечника у млекопитающего.

9. Применение полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, для профилактики и/или лечения у млекопитающего нарушения, выбранного из группы, включающей ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или нарушения, связанные с инсулинорезистентностью, диабет типа 2, диабет типа 1, гестационный диабет, преэклампсию, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертонию, неалкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с ожирением (увеличением веса), другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, атеросклероз, и состояния, изменяющие физическую целостность слизистого барьера кишечника, такие как пищевые аллергии, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействие радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис.

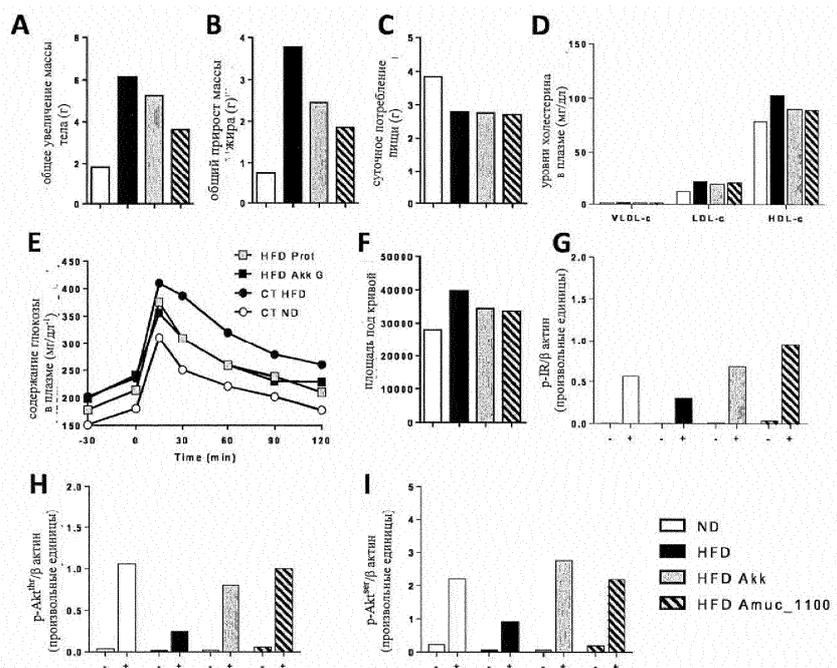
10. Применение полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, для стимуляции противовоспалительной активности в кишечнике млекопитающего.

11. Применение полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, для стимуляции снижения веса у млекопитающего.

12. Способ лечения и/или профилактики у млекопитающего нарушения, выбранного из группы, включающей ожирение, метаболический синдром, дефицит инсулина или нарушения, связанные с инсулинорезистентностью, диабет типа 2, диабет типа 1, гестационный диабет, преэклампсию, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертонию, неалкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с ожирением (увеличением веса), другие заболевания, связанные с нарушенной барьерной функцией, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, и состояния, изменяющие физическую целостность слизистого барьера кишечника, такие как пищевые аллергии, недоразвитость кишечника, например, вследствие преждевременных родов, воздействие радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность или нарушение питания, сепсис; для содействия снижению веса у млекопитающего; для содействия противовоспалительной активности в кишечнике млекопитающего; для стимулирования функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника у млекопитающего; для поддержания, восстановления или улучшения глюкозного и/или холестеринного и/или триглицеридного гомеостаза; или для поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности слизистого барьера кишечника млекопитающего, при этом способ включает стадию введения нуждающемуся в этом млекопитающему эффективного количества полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника.

13. Способ получения полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и способного осуществлять иммунную сигнализацию и/или влиять на барьерную функцию кишечника, и/или на глюкозный, и/или холестеринный, и/или триглицеридный гомеостаз, при этом способ включает стадии:

- а) культивирования бактерий вида *Akkermansia muciniphila* в применимой культуральной среде; и
- б) необязательно выделения полипептида, полученного на стадии (а).



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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