

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037315**(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.03.11**

**(51)** Int. Cl. **A61K 35/74** (2015.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201500535**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.11.15**

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ АККЕРМАНСИЯ МУЦИНИФИЛА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, УВЕЛИЧЕНИЯ РАСХОДА ЭНЕРГИИ И НАСЫЩЕНИЯ, СНИЖЕНИЯ ВЕСА, КОМПОЗИЦИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, КОСМЕТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

**(31)** PCT/EP2012/073011

**(32)** 2012.11.19

**(33)** EP

**(43)** 2016.03.31

**(86)** PCT/EP2013/073972

**(87)** WO 2014/076246 2014.05.22

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

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

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

**(56)** MURIEL DERRIEN ET AL.: "Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader Akkermansia muciniphila", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 2, January 2011 (2011-01), XP055074491, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00166, abstract, page 2, right column, paragraph 4-page 3, left column, paragraph 2

M. DERRIEN ET AL.: "Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 54, no. 5, September 2004 (2004-09), pages 1469-1476, XP055074486, ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ijs.0.02873-0, page 54, left column, paragraph 3-right column, paragraph 5; figure 3; table 1

MARK W.J. VAN PASSEL ET AL.: "The Genome of Akkermansia muciniphila, a Dedicated Intestinal Mucin Degradator, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes", PLOS ONE, vol. 6, no. 3, 3 March 2011 (2011-03-03), page e16876, XP055074483, DOI: 10.1371/journal.pone.0016876, abstract, page e16876, right column, paragraph 3

LE ROY T. ET AL.: "GUT MICROBIOTA TRANSPLANTATION DEMONSTRATES ITS CAUSAL ROLE IN THE DEVELOPMENT OF TYPE 2 DIABETES AND FATTY LIVER", JOURNAL OF HEPATOLOGY; 47TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN-ASSOCIATION-FOR-THE-STUDY-OF-THE-LIVER (EASL), MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK; BARCELONA, SPAIN, vol. 56, no. Suppl. 2, April 2012 (2012-04), page S23, XP008159945, ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/S0168-8278(12)60065-8 [retrieved on 2012-04-23] abstract

EP-A1-2030623

WO-A2-2008076696

HANSEN C.H.F. ET AL.: "Early life treatment with vancomycin propagates and reduces diabetes incidence in the NOD mouse", DIABETOLOGIA; CLINICAL AND EXPERIMENTAL DIABETES AND METABOLISM, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 55, no. 8, 10 May 2012 (2012-05-10), pages 2285-2294, XP035081573, ISSN: 1432-0428, DOI: 10.1007/S00125-012-2564-7, abstract

WO-A2-2013130773

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, XP055074467, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.12194511110, abstract

**(57)** Изобретение относится к Akkermansia muciniphila или к ее фрагментам для лечения метаболического нарушения у субъекта, нуждающегося в подобном лечении. Изобретение также относится к композиции, фармацевтической композиции и лекарственному средству, содержащему Akkermansia muciniphila или ее фрагменты, предназначенные для лечения метаболического нарушения. Изобретение также относится к использованию Akkermansia muciniphila или ее фрагментов для стимуляции потери веса у субъекта, нуждающегося в этом.

**037315 B1**

**037315 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к лечению метаболических нарушений, таких как, например, метаболические нарушения, ассоциированные с избыточным весом или ожирением, такие как, например, сахарный диабет или высокий уровень холестерина. Настоящее изобретение, более специфично, относится к композиции, содержащей *Akkermansia spp* или ее фрагменты и предназначенной для лечения метаболического нарушения.

### Уровень техники

Ожирение является общемировой проблемой, более конкретно, согласно подсчетам около 250 млн взрослых людей страдает от ожирения. Эта эпидемия ожирения коррелирует с существенным увеличением частоты заболеваний, ассоциированных с ожирением, таких как диабет, гипертония, сердечно-сосудистые заболевания и заболевания печени. По причине указанных инвалидизирующих заболеваний ожирение в настоящее время считается наиболее важной проблемой общественного здоровья в восточных странах. Таким образом, существует реальная потребность в композициях и способах, предназначенных для лечения и профилактики ожирения и/или заболеваний, ассоциированных с ожирением.

Ожирение и заболевания, ассоциированные с ожирением, также связаны с (i) метаболическими нарушениями (с влиянием на гомеостаз глюкозы и обмен жиров, например); (ii) низким уровнем воспалительного ответа, что связано с высоким уровнем липополисахаридов (LPS) в крови (что также обозначается термином метаболическая эндотоксемия) и (iii) нарушением барьерной функции кишечника (то есть повышенная проницаемость кишечной стенки). Для лечения ожирения необходимо воздействовать по крайней мере на один, предпочтительно второй, а еще более предпочтительно на третий из указанных трех факторов.

Кишечник человека колонизирован разнообразным, комплексным и динамическим сообществом микроорганизмов, представленных более 1000 видами различных бактерий, которые постоянно взаимодействуют с организмом-хозяином (Zoetendal, Rajilic-Stojanovic, de Vos, Gut 2008; 57: 1605-1615). Гомеостаз кишечной микрофлоры зависит от особенностей хозяина (возраст, пол, наследственность) и условий окружающей среды (стресс, прием лекарственных препаратов, наличие хирургических вмешательств, воздействие инфекционных и токсических агентов), а также от ежедневных изменений в диете. Появляется все больше доказательств, поддерживающих роль кишечной микрофлоры в развитии ожирения и сопутствующих ему заболеваний (Delzenne & Cani, Annu. Rev. Nutr. 2011, 31: 15-31).

Таким образом, лечение продуктами, воздействующими на микрофлору кишечника, представляется многообещающим терапевтическим подходом в лечении ожирения и ассоциированных с ним заболеваний. Указанные продукты могут состоять из живых микроорганизмов, например, как в случае с большинством пробиотиков, или содержать мертвые микроорганизмы или их фрагменты. Кроме того, такие продукты могут содержать субстраты, которые использует микрофлора кишечника, например, как в случае с пребиотиками, или же соединения, которые изменяют баланс кишечной микрофлоры, такие как специфические антимикробные соединения.

Например, в публикации WO/2008/076696 описывается, что микрофлора кишечника является терапевтической мишенью для лечения ожирения и ассоциированных с ним заболеваний. В публикации WO/2008/076696 специфически раскрываются способы изменения численности *Bacteroides* и/или *Firmicutes* в кишечнике субъекта за счет введения антибиотиков и/или пробиотиков.

Кроме того, EP 2030623 относится к профилактике и/или лечению метаболических нарушений, таких как, например, заболевания, ассоциированные с ожирением, путем регуляции количества энтеробактерий в кишечнике. Европейский патент 2030623 описывает уменьшение количества энтеробактерий в кишечнике путем введения пробиотических бактерий, таких как, например, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* или *Lactobacillus*.

Кроме того, авторы настоящего изобретения описали, что микрофлора кишечника изменяется у мышей, страдающих от ожирения, при лечении пребиотиками (Everard et al., Diabetes, 2011, 60:2775-86). Более того, пребиотики (1) улучшают метаболизм глюкозы и липидов у мышей с ожирением, (2) понижают уровень LPS в плазме и улучшают барьерную функцию кишечника (например, уменьшают воспаление) у мышей с ожирением, (3) индуцируют увеличение числа энтероэндокринных L-клеток у мышей с ожирением и (4) улучшают чувствительность к лептину и гомеостаз глюкозы у мышей, страдающих от диабета или индуцированного диетой ожирения.

Среди всех изменений, которые происходят при лечении пребиотиками мышей, страдающих от ожирения, также имеет место существенное изменение состава микрофлоры кишечника, которое характеризуется (i) увеличением количества *Bacteroides*, *Lactobacillus spp* и бактерий из группы *Bacteroides-Prevotella* и (ii) увеличением количества *Bifidobacterium spp.*, бактерий из группы *E. rectale/C. coccoides* и *Akkermansia muciniphila*, относящейся к *Verrucomicrobia*. *A. muciniphila*, бактерия, впервые идентифицированная в 2004 г. автором изобретения, составляет приблизительно от 1 до 3% от общей микрофлоры у здоровых взрослых людей (Derrien et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54:1469-1476; Derrien et al. Applied Environmental Microbiology 2008, 74, 1646-1648).

Существующие не прямые доказательства позволяют предположить наличие взаимосвязи между численностью *A. muciniphila* и кишечной дисфункцией или состояниями, ассоциированными с ожирением.

ем. Например, в публикации WO/2011/107481 описывается, что отсутствие *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта, в сочетании с присутствием *Bacteroides capillosus* и *Clostridium Upturn*, свидетельствует о том, что субъект страдает от язвенного колита. Кроме того, Hensen с коллегами показали, что введение антибиотика, Ванкомицина, неонатальным NOD мышам (мышинная NOD модель представляет собой модель диабета) подавляет клиническое начало диабета и способствует размножению *Akkermansia muciniphila* (Hensen et al., *Diabetologia*, 2012, 55:2285-94). Однако это может быть непрямым эффектом за счет невосприимчивости кишечной *Akkermansia* spp. к используемому антибиотику.

Таким образом, указанные результаты показывают, что общий состав кишечной микрофлоры изменяется после введения пребиотиков у мышей. Более детально, не существует доказательств относительно специфической роли какого-либо одного вида бактерий, такого как, например, *Akkermansia muciniphila* в положительном ответе на введение пребиотиков. Благоприятный эффект прямого введения *Akkermansia muciniphila* до настоящего времени нигде не описан и даже не предполагался.

#### **Краткое описание изобретения**

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что повторное введение *Akkermansia muciniphila* воздействует на три составляющих дисфункции, которые лежат в основе ожирения и ассоциированных с ним заболеваний, то есть на метаболические дисфункции, низкий уровень воспалительного ответа, который связан с повышенным уровнем липополисахаридов (LPS) в крови, а также на нарушенную барьерную функцию кишечника.

Таким образом, настоящее изобретение относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагментам, предназначенным для лечения, или для использования в лечении, метаболического нарушения у субъекта, нуждающегося в подобном лечении. Согласно одному варианту осуществления изобретения указанное метаболическое нарушение представляет собой ожирение. Согласно другому варианту осуществления изобретения указанное метаболическое нарушение выбрано из группы, включающей метаболический синдром, заболевания, ассоциированные с инсулиновой недостаточностью или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (такой как, например, сахарный диабет 2-го типа), нарушение толерантности к глюкозе, нарушенный метаболизм липидов, атеросклероз, гипертония, сердечная патология, инфаркт, неалкогольная жировая болезнь печени, гипергликемия, жировой гепатоз, дислипидемия, дисфункция иммунной системы, ассоциированная с избыточным весом и ожирением, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, астма, апноэ во сне, остеоартрит, нейродегенеративные заболевания, заболевания желчного пузыря, X синдром, воспалительные и иммунные заболевания, атерогенная дислипидемия и рак.

Настоящее изобретение также относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагментам предназначенным для повышения основного обмена субъекта предпочтительно без воздействия на режим питания указанного субъекта. Настоящее изобретение также относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагментам, предназначенным для усиления чувства насыщения у субъекта.

Согласно ещё одному варианту изобретения жизнеспособные клетки *Akkermansia muciniphila* вводят субъекту, нуждающемуся в этом.

Согласно ещё одному варианту *Akkermansia muciniphila* вводится перорально.

Согласно ещё одному варианту количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится субъекту, варьирует приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ, еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ. Согласно другому варианту осуществления изобретения количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится субъекту, варьирует приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{11}$  КОЕ, еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ.

Согласно одному из вариантов изобретения *Akkermansia muciniphila* вводится по крайней мере один раз в день. Согласно ещё одному варианту *Akkermansia muciniphila* вводится по крайней мере три раза в неделю. Согласно другому варианту изобретения *Akkermansia muciniphila* вводится по крайней мере один раз в неделю.

Согласно одному варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* вводится одновременно с другим пробиотическим штаммом и/или с одним или более пребиотиком.

Другим объектом настоящего изобретения является композиция, предназначенная для лечения или для использования в лечении метаболического нарушения, а также для повышения основного обмена или для усиления чувства насыщения у субъекта, содержащая *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты, как описано выше, вместе с эксципиентом. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения указанная композиция вводится перорально.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, предназначенной для лечения или для использования в лечении метаболического нарушения, а также для повышения основного обмена или для усиления чувства насыщения у субъекта, содержащей *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты, как описано выше, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Другим объектом настоящего изобретения является лекарственное средство, предназначенное для

лечения или для использования в лечении метаболического нарушения, а также для повышения основного обмена или для усиления чувства насыщения у субъекта, содержащее *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты, как описано выше.

Ещё одним объектом настоящего изобретения является использование *Akkermansia muciniphila* или ее фрагментов для стимуляции потери веса у субъекта, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение также относится к косметической композиции, содержащей *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты, предназначенной для стимуляции потери веса у субъекта, нуждающегося в этом.

Определения.

В описании настоящего изобретения следующие термины имеют следующие значения.

"Лечение" означает предотвращение (то есть препятствие возникновению), уменьшение или подавление по крайней мере одного эффекта или симптома заболевания, патологического состояния или нарушения. Таким образом, указанный термин относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическому или превентивным мерам; при этом цель заключается в предотвращении или замедлении (уменьшении) интересующего патологического состояния или нарушения. Согласно одному варианту осуществления изобретения, к тем, кто нуждается в лечении относятся субъекты, которые уже страдают от заболевания, а также субъекты, предрасположенные к развитию заболевания или субъекты, нуждающиеся в профилактике заболевания.

"Эффективное количество" относится к уровню или количеству агента, которое предназначено для (и при этом не вызывает каких-либо значительных негативных или серьезных побочных эффектов у субъекта) (1) замедления или предотвращения дебюта метаболического нарушения; (2) замедления или прекращения прогрессирования, ухудшения или усугубления одного или более симптома метаболического нарушения; (3) облегчения имеющихся симптомов метаболического нарушения; (4) уменьшения тяжести или заболеваемости метаболического нарушения; (5) лечения метаболического нарушения; (6) восстановления нормального количества и/или пропорции *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта, получающего лечение. Эффективное количество может вводиться до начала метаболического нарушения, с профилактической или превентивной целью. Альтернативно или дополнительно, эффективное количество может вводиться после начала метаболического нарушения, с терапевтической целью.

"*Akkermansia muciniphila*" относится к строго анаэробной муцин-деградирующей бактерии, идентифицированной Derrien (Derrien et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54:1469-1476). Клетки имеют овальную форму, неподвижны и являются грам-отрицательными. *Akkermansia muciniphila* также может обозначаться как *Akkermansia* spp. или *Akkermansia*-подобная бактерия. Она относится к группе Chlamydiae/Verrucomicrobia; тип Verrucomicrobia. Если таксономия изменится, специалисту в данной области будет понятно, каким образом адаптировать изменения в таксономии для определения штаммов, которые могут использоваться согласно настоящему изобретению. Кроме того, полный геном *Akkermansia muciniphila* был также определен авторами изобретения (van Passel et al., PLoS One 6, 2011:6876). Общепринято, что если штаммы имеют геномную идентичность около 70%, то они относятся к одному виду.

"Пробиотики" относятся к композициям микробных клеток (таких как, например, живые микробные клетки) или компонентам микробных клеток которые, при введении в эффективном количестве, оказывают благоприятный эффект на здоровье и хорошее самочувствие субъекта. По определению все пробиотики имеют доказанные непатогенные свойства. Согласно одному варианту осуществления изобретения указанные преимущества для здоровья субъекта связаны с улучшением баланса между человеческой и животной микрофлорой в желудочно-кишечном тракте, и/или с восстановлением нормальной микрофлоры.

"Пребиотики" относятся к веществам, таким как, например, пищевые вещества, которые не перевариваются в организме человека, но которые могут использоваться бактериями микрофлоры кишечника и которые направлены на усиление роста пробиотических бактерий в кишечнике.

"Избыточный вес" означает ситуацию, при которой субъект имеет индекс массы тела (ВМТ или ИМТ), составляющий от 25 до 30. Используемый в настоящем описании ИМТ определяется как индивидуальная масса тела (в кг), разделенная на квадрат роста субъекта (в метрах).

"Ожирение" означает ситуацию, при которой субъект имеет ИМТ выше или равный 30.

"Субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно к человеку. Согласно одному варианту осуществления изобретения субъект является субъектом мужского пола. Согласно другому варианту осуществления изобретения под субъектом также может пониматься домашний питомец, такой как, например, собака, кошка, морская свинка, хомяк, крыса, мышь, хорек, кролик и подобные животные.

"Приблизительно", если употребляется перед какой-либо количественной величиной, означает, что величина может иметь отклонения плюс-минус 20%, предпочтительно 10% в любую сторону.

"Фрагмент" может обозначать клеточные компоненты, метаболиты, секретируемые молекулы и соединения, являющиеся результатом метаболизма *Akkermansia muciniphila* и подобных бактерий. Фрагменты могут быть получены, например, путем восстановления супернатанта культуры *Akkermansia mu-*

*Acetivibrio*, или путем экстракции клеточных компонентов или клеточных фракций, метаболитов или секретируемых соединений из культуры *Akkermansia muciniphila*. Термин фрагмент также может относиться к продукту деградации. Термин фрагмент может относиться к компоненту в изолированном виде или к любой смеси одного или более компонентов, полученных из *Akkermansia muciniphila*. Согласно одному варианту осуществления изобретения термин фрагмент может относиться к одному или более такому компоненту, присутствующему у *Akkermansia muciniphila*, который получают другим способом, например, с использованием технологий рекомбинантной ДНК, в микробной клетке-хозяине или при помощи любого другого (био)синтетического процесса.

"Метаболическое нарушение" относится к нарушениям, заболеваниям и состояниям, вызываемым или характеризующимся аномальной прибавкой в весе, использованием или потреблением энергии, измененными ответами на непереваренные или эндогенные нутриенты, энергетические ресурсы, гормоны или другие сигнальные молекулы организма, или измененным метаболизмом углеводов, жиров, белков, нуклеиновых кислот или их комбинаций. Метаболическое нарушение может ассоциироваться, как с дефицитом, так и с избытком метаболических путей, которые приводят к нарушению баланса в метаболизме углеводов, жиров, белков и/или нуклеиновых кислот. Примерами метаболических нарушений являются, без ограничений указанными, метаболический синдром, заболевания, ассоциированные с инсулиновой недостаточностью или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (такой как, например, сахарный диабет 2-го типа), нарушение толерантности к глюкозе, нарушенный метаболизм липидов, атеросклероз, гипертония, сердечная патология, инфаркт, неалкогольная жировая болезнь печени, гипергликемия, жировой гепатоз, дислипидемия, дисфункция иммунной системы, ассоциированная с избыточным весом и ожирением, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, астма, апноэ во сне, остеоартрит, нейродегенеративные заболевания, заболевания желчного пузыря, X синдром, воспалительные и иммунные заболевания, атерогенная дислипидемия и рак.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет собой комбинацию графиков, показывающих, что численность *Akkermansia muciniphila* снижается у мышей, страдающих от ожирения и диабета, при этом лечение пребиотиками приводит к восстановлению количества бактерий и излечивает метаболическую эндотоксемию и сопутствующие заболевания: (а) численность *Akkermansia muciniphila* ( $\text{Log}_{10}$  бактерий/г содержимого слепой кишки), измеренная в содержимом слепой кишки у мышей с ожирением ( $n=5$ ), дефицитных по лептину (ob-ob), а также у мышей из того же помета, не страдающих ожирением (худых) ( $n=5$ ); (б) численность *Akkermansia muciniphila* ( $\text{Log}_{10}$  бактерий/г содержимого слепой кишки), измеренная в содержимом слепой кишки у мышей с ожирением на обычной диете (ob-CT) или получавших лечение пребиотиками (ob-Pre) в течение 5 недель ( $n=10$ ); (в) численность *Akkermansia muciniphila* ( $\text{Log}_{10}$  бактерий/г содержимого слепой кишки), измеренная в содержимом слепой кишки у контрольных мышей на контрольной диете (CT) или у мышей на контрольной диете, получавших пребиотики (CT-Pre), добавленные в водопроводную воду, а также у мышей на HF диете (HF) и у мышей на HF диете, получавших пребиотики (HF-Pre), добавленные в водопроводную воду, в течение 8 недель ( $n=10$ ); (д) уровни LPS в сыворотке, измеренные в портальной вене ( $n=7-9$ ); (е) экспрессия мРНК маркера инфильтрации макрофагами жировой ткани CD11c мРНК ( $n=10$ ); (ф) корреляция Пирсона между  $\log$  величинами уровней LPS в сыворотке портальной вены и численностью *Akkermansia muciniphila* ( $\text{Log}_{10}$  бактерий/г содержимого слепой кишки), на вкладке показан коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) и соответствующая  $P$  величина; (г) общая прибавка в весе, измеренная при помощи пространственно-временной ядерной магнитно-резонансной томографии ( $n=10$ ). Данные в а-в представлены в виде коробчатой диаграммы. \*  $P<0,05$  в двустороннем  $t$ -критерии Стьюдента. Данные в е-г были получены в той же группе мышей. Данные в д, е и г представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу ( $P<0,05$ ) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 2 представляет собой комбинацию графиков и рисунков, показывающих, что *Akkermansia muciniphila* изменяет состав микрофлоры кишечника, препятствует развитию индуцированной диетой дисфункции кишечного барьера, изменяет уровень эндоканнабиноидов в кишечнике и излечивает метаболические нарушения у мышей с индуцированным диетой ожирением. Мыши принудительно получали суточную пероральную дозу *Akkermansia muciniphila* ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного буферного раствора (PBS)) и контрольную диету (CT-Akk) или HF-диету (HF-Akk), их сравнивали с мышами, получавшими контрольную диету (CT) или диету, с высоким содержанием жиров (HF), которым также принудительно вводили эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS в течение 4 недель ( $n=10$ ): (а) PCA анализ, основанный на MITChip филогенетических фингерпринтах микрофлоры кишечника из содержимого слепой кишки контрольных групп (CT и HF) и групп, получавших *Akkermansia muciniphila* (CTA и HFA); (б) уровни LPS в сыворотке портальной вены ( $n=6-10$ ); (в) общая прибавка в весе, измеренная при помощи пространственно-временной ядерной магнитно-резонансной томографии ( $n=10$ ); (д) индекс резистентности к инсулину определяли путем умножения площади под кривой (от 0 до 15 мин) на уровень глюкозы и уровень инсулина в плазме, которые измеряли после пероральной нагрузки глюкозой (2 г глюкозы на 1 кг массы тела), через 4

недели после лечения (n=10); (e) экспрессия мРНК маркера инфильтрации макрофагами жировой ткани CD11c (n=10); (f) экспрессия мРНК маркера дифференцировки адипоцитов (ССААТ/энхансер-связывающий белок-сс, кодируемый *Sebpa*), липогенеза (ацетил-КоА карбоксилаза, кодируемая *Acc1*; синтетгаза жирных кислот, кодируемая *Fasn*) и окисления липидов (карнитин пальмитоилтрансфераза-1, кодируемая *Cpt1*; ацил-КоА-оксидаза, кодируемая *Acox1*; коактиватор гамма рецептора активируемого пролифератором пероксисом, кодируемый *Pgclα*; и альфа-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, кодируемый *Ppara*) измеряли в депо висцерального жира (мезентериальный жир) (n=10); (g) 2-пальмитоилглицерол (2-PG) 2-олеоилглицерол (2-OG), 2-арахидоноилглицерол (2-AG) в подвздошной кишке (экспрессируемые как % от контроля), (n=10); (h) толщина слизистого слоя, измеренная при помощи гистологического анализа с последующим окрашиванием альциановым голубым. Для измерения толщины слизистого слоя использовали показательные изображения после окрашивания альциановым голубым, стрелки = 40 мкм (n=7-8); (i) экспрессия мРНК 3-гамма фактора регенерации толстой кишки, выделенного из островков (*Reg1γ*, кодируемый *Reg3g*) (n=10). Данные в a-i были получены в одной группе мышей. Данные в b-i представлены как среднее ± среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными (P<0,05) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 3 представляет собой комбинацию графиков и рисунков, показывающих, что у мышей, получавших лечение пребиотиками, возникают обратные взаимосвязи между *Akkermansia muciniphila* и инфильтрацией макрофагами жировой ткани или прибавкой жировой массы: (a) корреляция Пирсона между уровнем мРНК CD11c жировой ткани и численностью *Akkermansia muciniphila* ( $\text{Log}_{10}$  бактерий/г содержимого слепой кишки, измеренной в содержимом слепой кишки у мышей на контрольной диете (СТ) или у мышей на контрольной диете, получавших пребиотики (СТ-Pre), добавленные в водопроводную воду, а также у мышей на HF диете (HF) или мышей на HF диете, получавших пребиотики (HF-Pre), добавленные в водопроводную воду, в течение 8 недель, на вкладках показан коэффициент корреляции Пирсона (r) и соответствующая P величина; (b) вес подкожного, мезентериального и эпидермального жирового депо (г на 100 г массы тела) (n=10); (c) корреляция Пирсона между приростом массы жировой ткани и численностью *Akkermansia muciniphila* в содержимом слепой кишки ( $\text{Log}_{10}$  бактерий/г содержимого слепой кишки), на вкладках показан коэффициент корреляции Пирсона (r) и соответствующая P величина. Данные в a-c были получены в одной группе мышей и представлены как среднее ± среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными (P<0,05) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 4 представляет собой комбинацию графиков и рисунков, на которых показано, что ежедневное пероральное принудительное введение *Akkermansia muciniphila* увеличивает численность указанной бактерии в содержимом слепой кишки. Численность *Akkermansia muciniphila* выражается как (a) % от общего 16S РНК или (b) как Log ДНК копий, измеренный у мышей, принудительно получавших суточную пероральную дозу *Akkermansia muciniphila* ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS)) и находящихся на контрольной диете (СТ-Akk) или на HF-диете (HF-Akk), данные сравнивали с данными, полученными для мышей на контрольной диете (СТ) или диете с высоким содержанием жиров (HF), которым также принудительно вводили эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS в течение 4 недель (n=10).

Фиг. 5 представляет собой комбинацию графиков и рисунков, показывающих, что лечение *Akkermansia muciniphila* приводит к снижению массы тела без влияния на пищевую рацион. (a) Вес подкожного, мезентериального и эпидидимального жировых депо (г на 100 г массы тела) у мышей, принудительно получавших суточную пероральную дозу *Akkermansia muciniphila* ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS), находящихся на контрольной диете (СТ-Akk) или на HF-диете (HF-Akk), или у мышей на контрольной диете (СТ) или у мышей на диете с повышенным содержанием жиров (HF), которым также принудительно вводили эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS в течение 4 недель (n=10); (b) Суммарное потребление пищи (г) в течение 4-х недель лечения; (c) конечная масса тела (n=10); (d) конечная масса жира и масса нежировых тканей, выраженная в процентах от общей конечной массы тела и измеренная при помощи 7,5 МГц пространственно-временной ЯМР (LF50 minispec; Bruker, n=10). Данные представлены как среднее ± среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными (P<0,05) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 6 представляет собой комбинацию графиков и рисунков, показывающих, что лечение *Akkermansia muciniphila* нормализует гликемию натощак и снижает экспрессию мРНК *G6pc* в печени: (a) гликемия натощак, измеренная у мышей, принудительно получавших суточную пероральную дозу *Akkermansia muciniphila* ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS), находящихся на контрольной диете (СТ-Akk) или на HF-диете (HF-Akk), и находящихся на контрольной диете (СТ) или у мышей на диете с повышенным содержанием жиров (HF), которым также принудительно вводили эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS в

течение 4 недель (n=10); (b) уровни экспрессии мРНК глюкозо-6-фосфатазы (кодируемой *G6pc*) измеренные в печени в конце 4-х недельного периода лечения (n=10). Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными ( $P < 0,05$ ) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 7 представляет собой комбинацию графиков и рисунков, показывающих, что лечение *Akkermansia muciniphila* оказывает минимальное воздействие на содержание антибактериальных пептидов в подвздошной кишке и уровень IgA в фекалиях. Экспрессия мРНК антибактериальных пептидов: (a) фактор регенерации гамма-3, выделенный из островков (*RegIII*, кодируемый *Reg3g*); (b) фосфолипазы A2 группы PA (кодируемой *Pla2g2a*); (c)  $\alpha$ -дефенсины (кодируемые *Defa*) и (d) лизозим C (кодируемый *Lyzl*), измеренная в подвздошной кишке мышей, принудительно получавших суточную пероральную дозу *Akkermansia muciniphila* ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS)), и находящихся на контрольной диете (СТ-Akk) или на HF-диете (HF-Akk), или у мышей на контрольной диете (СТ) или на диете с повышенным содержанием жиров (HF), которым также принудительно вводили эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS в течение 4 недель (n=10); (e) уровни IgA в фекалиях (мкг/г фекалий). Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Данные с разными надстрочными буквами являются по существу различными ( $P < 0,05$ ) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 8 представляет собой комбинацию гистограмм, графиков и изображений, показывающих, что инактивируемая теплом *A. muciniphila* не обладает способностью нейтрализовать эндотоксическую токсемию, не излечивает индуцированное диетой ожирение, нарушение толерантности к глюкозе при пероральном введении, не улучшает метаболизм жировой ткани и барьерную функцию кишечника у мышей, с индуцированным диетой ожирением. Контрольные мыши получали контрольную (СТ) диету или HF диету (HF), а также принудительное пероральное введение стерильного анаэробного PBS и глицерола в течение 4 недель ежедневно. Мыши из лечебной группы получали принудительную пероральную дозу живых *A. muciniphila* (HF-Akk) или метаболически инактивированных *A. muciniphila* (HF-K-Akk) ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS)) и находились на HF диете (n=8): (a) уровни LPS в сыворотке портальной вены (n=6-7); (b) общая прибавка массы тела, измеренная при помощи пространственно-временной ядерной магнитно-резонансной томографии (n=7-8); (c) профиль уровня глюкозы в плазме после пероральной нагрузки глюкозой в дозе 2 г/кг у мышей, неограниченных в движении, и гистограмма (d), показывающая среднюю площадь под кривой (AUC), измеренную между 0- и 120-минутой после нагрузки глюкозой (n=7-8); (e) экспрессия мРНК маркеров дифференцировки адипоцитов (*Ce3ra*), липогенеза (*Accl*; *Fasn*) и окисления липидов (*Cpt1*; *Acox1*; *Pgcl* и *Ppara*), измеренная в висцеральных жировых депо (мезентериальный жир) (n=8); (f) толщина слизистого слоя, измеренная при помощи гистологического анализа после окрашивания альциановым голубым (СТ n=4, HF n=6, HF-Akk и HF-K-Akk n=5); (g) для измерения толщины слизистого слоя использовали показательные изображения после окрашивания альциановым голубым, стрелки = 40 мкм, M = слизистая, IM = внутренний слизистый слой. Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными ( $P < 0,05$ ) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 9 представляет собой комбинацию гистограмм, показывающих, что инактивированная теплом *A. muciniphila* не уменьшает массу подкожного, мезентериального и эпидидимального жира и не увеличивает содержание кишечных антимикробных пептидов у мышей на HF диете: (a) вес подкожного, мезентериального и эпидидимального жировых депо (в граммах на 100 г массы тела), измеренный у мышей из контрольной группы на контрольной (СТ) или HF диете (HF), получавших перорально стерильный анаэробный PBS и глицерол в течение 4 недель ежедневно. Мыши из лечебной группы получали принудительную пероральную дозу живых *A. muciniphila* (HF-Akk) или мертвых *A. muciniphila* (HF-K-Akk) ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS)) и находились на HF диете (n=8); (b) экспрессия мРНК 3-гамма фактора регенерации толстой кишки, выделенного из островков (*RegIII*, кодируемый *Reg3g*) (n=8-18), данные представляют результаты двух исследований *A. muciniphila*. Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными ( $P < 0,05$ ) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 10 представляет собой комбинацию гистограмм, показывающих эффективность лечения *A. muciniphila* при введении трижды в неделю в течение 8 недель: (a) масса тела (г), измеренная у контрольных мышей на контрольной диете (СТ) (n=8) или на HF диете (HF) (n=10), принудительно получавших три раза в неделю стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерол или *A. muciniphila* перорально (HF-Akk) (n=10) в течение 8 недель ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS)); (b) масса подкожного жира; (c) висцеральные жировые депо (мезентериальный и эпидидимальный). Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадра-

тичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными ( $P < 0,05$ ), согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

Фиг. 11 представляет собой гистограмму, показывающую, что *A. muciniphila* снижает уровень холестерина в плазме у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров: (CT) мыши на контрольной диете; (Akk) мыши, принудительно получавшие суточную дозу *A. muciniphila* перорально ( $2 \cdot 10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS)) и находящиеся на контрольной диете; (HF) мыши, получавшие диету с высоким содержанием жиров; (HF-Akk) мыши, принудительно получавшие суточную дозу *Accermansia muciniphila* ( $10^9$  бактериальных клеток, суспендированных в 100 мкл стерильного анаэробного фосфатного буферного солевого раствора (PBS)) и находящиеся на HF диете.

Фиг. 12 представляет собой комбинацию гистограмм, показывающих, что *L. plantarum* WCFS1 не улучшает метаболизм в жировой ткани и кишечную барьерную функцию у мышей с индуцированным диетой ожирением.

Контрольные мыши получали контрольную (CT) диету или HF диету (HF), а также принудительное пероральное введение стерильного анаэробного PBS и глицерола в течение 4 недель ежедневно. Мыши из лечебной группы получали принудительную пероральную дозу *L. plantarum* WCFS1 (HF-LP) ( $2 \cdot 10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного солевого буфера (PBS)) и находились на HF диете ( $n=7-8$ ): (a) конечная масса жира, измеренная при помощи пространственно-временной ЯМР ( $n=7-8$ ); вес подкожного, мезентериального и эпидидимального жировых депо (г/100 г массы тела) ( $n=7-8$ ); (b) экспрессия мРНК маркеров дифференцировки адипоцитов (*Ce3pa*), липогенеза (*Accl*; *Fasn*) и окисления липидов (*Cpt1*; *Acox1*; *Pgcl* и *Ppara*), измеренная в висцеральных жировых депо (мезентериальный жир) ( $n=7-8$ ); (c) толщина слизистого слоя, измеренная при помощи гистологического анализа после окрашивания альциановым голубым ( $n=4-6$ ); (d) уровни LPS в сыворотке портальной вены ( $n=6-7$ ); (e) экспрессия мРНК кишечного *RegIII* (кодируемого *Reg3g*) ( $n=8-18$ ). Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Данные с разными верхними индексами являются по существу различными ( $P < 0,05$ ) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагментам, предназначенным для лечения или для использования в лечении метаболических нарушений у субъекта, нуждающегося в подобном лечении. Используемый здесь термин метаболическое нарушение относится к нарушению, связанному с измененным метаболическим гомеостазом, таким как, например, измененный гомеостаз глюкозы или жиров.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения указанным метаболическим нарушением является ожирение.

Примерами других метаболических нарушений являются, без ограничений указанными, метаболический синдром, заболевания, ассоциированные с инсулиновой недостаточностью или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (такой как, например, сахарный диабет 2-го типа), нарушение толерантности к глюкозе, нарушенный метаболизм липидов, атеросклероз, гипертония, сердечная патология, инфаркт, неалкогольная жировая болезнь печени, гипергликемия, жировой гепатоз, дислипидемия, дисфункция иммунной системы, ассоциированная с избыточным весом и ожирением, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, астма, апноэ во сне, остеоартрит, нейродегенеративные заболевания, заболевания желчного пузыря, X синдром, воспалительные и иммунные заболевания, атерогенная дислипидемия и рак.

Согласно другому варианту осуществления изобретения указанное метаболическое нарушение ассоциировано с избыточным весом и/или ожирением, то есть представляет собой метаболическое нарушение, которое может быть связано с избыточным весом и/или ожирением или может быть следствием избыточного веса и/или ожирения. Примерами такого метаболического нарушения, ассоциированного с избыточным весом и/или ожирением, являются, без ограничений указанными, метаболический синдром, заболевания, ассоциированные с инсулиновой недостаточностью или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (такой как, например, сахарный диабет 2-го типа), нарушение толерантности к глюкозе, нарушенный метаболизм липидов, атеросклероз, гипертония, сердечная патология, инфаркт, неалкогольная жировая болезнь печени, гипергликемия, жировой гепатоз, дислипидемия, дисфункция иммунной системы, ассоциированная с избыточным весом и ожирением, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, астма, апноэ во сне, остеоартрит, нейродегенеративные заболевания, заболевания желчного пузыря, X синдром, воспалительные и иммунные заболевания, атерогенная дислипидемия и рак.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения указанным метаболическим нарушением является сахарный диабет, предпочтительно диабет 2-го типа. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения указанным метаболическим нарушением является гиперхолестеринемия (также известная как повышенный уровень холестерина). Согласно одному из вариантов осуществления изобретения гиперхолестеринемия соответствует концентрации холестерина в плазме выше или равной 2 г/л

или 5 ммоль/л. Согласно другому варианту осуществления изобретения гиперхолестеринемия соответствует соотношению концентрации общего холестерина в плазме к концентрации липопротеинов высокой плотности (HDL, от англ. High Density Lipoprotein cholesterol, ЛПВП) выше или равному 4, 5:1, предпочтительно 5:1.

Согласно одному из вариантов живые штаммы *Akkermansia muciniphila*, используемые в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно получают из клеток в стационарной фазе роста.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* может быть в форме жизнеспособных клеток. Согласно другому варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* может быть в форме нежизнеспособных клеток.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения в соответствии с изобретением используются активные клетки *Akkermansia muciniphila*. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения штаммы *Akkermansia muciniphila* не являются метаболически инактивированными, при этом метаболическая инактивация может быть результатом, например, обработки в автоклаве.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты являются полностью очищенными. Используемый в контексте термин "полностью очищенные" означает, что *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты находятся в образце, который представлен по крайней мере приблизительно 50%, предпочтительно по крайней мере приблизительно 60, 70, 80, 90, 95, 99% или более бактериальных штаммов или фрагментов указанной бактерии.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей эффективное количество *Akkermansia muciniphila* или ее фрагментов, предназначенной для лечения или для использования в лечении метаболического нарушения.

Согласно одному варианту осуществления изобретения эффективное количество *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству бактерий, которое является достаточным для восстановления нормального количества и/или соотношения *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта. Более того, авторы изобретения показали, что кишечник субъекта, страдающего от избыточного веса или ожирения, не содержит *Akkermansia muciniphila* (примеры). Согласно другому варианту осуществления изобретения нормальное количество и/или соотношение *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству и/или соотношению *Akkermansia muciniphila*, которое присутствует в кишечнике здорового субъекта.

Термин "здоровый субъект" используется в настоящем описании для определения субъекта, который не страдает заболеванием, требующим лечения. Например, если *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты используются для лечения ожирения, то здоровый субъект - это субъект, не страдающий ожирением. Предпочтительно здоровый субъект имеет общие характеристики с субъектом, которому необходимо лечение, такие как, например, аналогичный пол, возраст, диета, употребление лекарственных препаратов или месторасположение.

Согласно одному варианту осуществления изобретения нормальное соотношение *Akkermansia muciniphila* в кишечнике варьирует приблизительно от 0,1 до приблизительно 10% (число клеток *Akkermansia muciniphila* по отношению к общему числу бактериальных клеток в кишечнике), предпочтительно приблизительно от 0,3 до приблизительно 5%, более предпочтительно приблизительно от 1 до приблизительно 3%.

Согласно другому варианту осуществления изобретения эффективное количество *Akkermansia muciniphila* составляет приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ, при этом КОЕ означает "колониобразующую единицу".

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения эффективное количество *Akkermansia muciniphila* составляет приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения эффективное количество *Akkermansia muciniphila* составляет приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения эффективное количество фрагмента *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству фрагментов, полученных из приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ, при этом КОЕ означает "колониобразующую единицу". Согласно другому варианту осуществления изобретения эффективное количество фрагмента *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству фрагментов, полученных из приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения эффективное количество фрагмента *Akkermansia mu-*

*ciniphila* соответствует количеству фрагментов, полученных из приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ.

Согласно одному варианту осуществления изобретения заявленная композиция содержит количество *Akkermansia muciniphila*, которое составляет приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ/г от веса композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ/г от веса композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г от веса композиции и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/г от веса композиции. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения заявленная композиция содержит количество *Akkermansia muciniphila*, которое составляет приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ/мл от объема композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ/мл от объема композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/мл от объема композиции и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/мл от объема композиции. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения заявленная композиция содержит количество *Akkermansia muciniphila*, которое составляет приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г от веса композиции, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г от веса композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г от веса композиции. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения заявленная композиция содержит количество *Akkermansia muciniphila*, которое составляет приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/г или КОЕ/мл.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения заявленная композиция содержит количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое соответствует количеству фрагментов, полученных приблизительно из  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции. Согласно другому варианту осуществления изобретения заявленная композиция содержит количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое соответствует количеству фрагментов, полученных приблизительно из  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г или КОЕ/мл композиции и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции. Согласно другому варианту осуществления изобретения заявленная композиция содержит количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое соответствует количеству фрагментов, полученных приблизительно из  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/г или мл в композиции, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/г или КОЕ/мл в композиции.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента и по крайней мере один фармацевтически приемлемый эксципиент. Согласно одному варианту осуществления изобретения заявленная фармацевтическая композиция предназначена для лечения метаболического нарушения. Согласно другому варианту осуществления изобретения фармацевтическая композиция предназначена для восстановления нормального соотношения *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта, которому это необходимо.

Используемый в контексте термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" относится к эксципиенту, который не оказывает серьезного, аллергического или любого другого нежелательного эффекта при введении в организм животного, предпочтительно человека. К таким эксципиентам относятся любые или все растворители, дисперсионные среды, покрывающие агенты, изотонические растворы или агенты, замедляющие абсорбцию, а также подобные вещества. Для введения в организм человека, соединения должны удовлетворять критериям стерильности, пирогенности, общей безопасности и стандартам очистки, как требуется с Биологическими стандартами Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA).

Настоящее изобретение также относится к лекарственному препарату, содержащему эффективное количество *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения заявленное лекарственное средство предназначено для лечения метаболического нарушения. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для восстановления нормального соотношения *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта, которому это необходимо.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения метаболического нарушения у субъекта, нуждающегося в подобном лечении, при этом указанный способ включает введение эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту.

Другой целью настоящего изобретения является способ восстановления нормального соотношения *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает введение эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, или композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство, вводятся по крайней мере один раз в неделю, предпочтительно по крайней мере два раза в неделю, более предпочтительно по крайней мере три раза в неделю и еще более предпочтительно три раза в неделю. Согласно другому варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, или композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство, вводится по крайней мере один раз в день и предпочтительно по крайней мере два раза в день.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, или композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, вводятся в течение одной недели, предпочтительно в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель или дольше.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, или композиция, фармацевтическая композиция или лекарственное средство, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, вводятся в течение периода времени, который продолжается до тех пор, пока не будет достигнут желаемый результат (например, снижение массы тела, лечение метаболического нарушения, снижение уровня холестерина в плазме).

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента, или композиции, фармацевтической композиции или лекарственного средства, заявленных в соответствии с настоящим изобретением, является постоянным, то есть не ограничено по времени.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения суточное количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, составляет от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения суточное количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня составляет от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения суточное количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, составляет от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения суточное количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, соответствует количеству фрагментов, полученных приблизительно из  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут. Согласно другому варианту осуществления изобретения суточное количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, соответствует количеству фрагментов, полученных приблизительно из  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут. Согласно другому варианту осуществления изобретения суточное количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, соответствует количеству фрагментов, полученных приблизительно из  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения субъект имеет избыточный вес. Согласно другому варианту осуществления изобретения субъект страдает от ожирения.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения, у субъекта диагностировано метаболическое нарушение, такое как, например, метаболическое нарушение, ассоциированное с избыточным весом или ожирением.

Согласно другому варианту осуществления изобретения у субъекта имеется риск развития метаболического нарушения, такого как, например, метаболическое нарушение, ассоциированное с избыточным весом или ожирением. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения указанный риск обусловлен фактом наличия у субъекта избыточного веса или ожирения. Согласно другому варианту осуществления изобретения указанный риск обусловлен предрасположенностью, например, такой как семей-

ная предрасположенность к метаболическому нарушению, такому как, например, метаболическое нарушение, ассоциированное с избыточным весом или ожирением.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения у субъекта имеется нарушение композиции микрофлоры кишечника. Предпочтительно микрофлора кишечника указанного субъекта истощена по штаммам *Akkermansia muciniphila*. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения соотношение *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта ниже 1%, предпочтительно ниже 0,5%, более предпочтительно ниже 0,1% по количеству клеток *Akkermansia muciniphila* к общему количеству бактериальных клеток в кишечнике.

Настоящее изобретение также относится к использованию *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента в косметических целях, для стимуляции потери веса у субъекта.

Другим объектом настоящего изобретения, таким образом, является косметическая композиция, содержащая косметически эффективное количество *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента, а также использование указанной композиции для стимуляции потери веса у субъекта. Используемый в контексте термин "косметически эффективное количество" относится к количеству косметической композиции, необходимому и достаточному для получения косметического эффекта, такого как, например, стимуляция потери веса у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу стимуляции потери веса у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ заключается во введении указанному субъекту косметически эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента.

Согласно одному варианту осуществления изобретения заявленный способ включает введение субъекту косметически эффективного количества композиции или косметической композиции, заявленной в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения косметически эффективное количество *Akkermansia muciniphila* составляет приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ. Согласно другому варианту осуществления изобретения косметически эффективное количество *Akkermansia muciniphila* составляет приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ. Согласно другому варианту осуществления изобретения косметически эффективное количество *Akkermansia muciniphila* составляет приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагмента *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству фрагментов, полученных из приблизительно от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^4$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ. Согласно другому варианту осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагмента *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству фрагментов, полученных из приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ. Согласно другому варианту осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагмента *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству фрагментов, полученных из приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, или композиция или косметическая композиция, вводится субъекту по крайней мере один раз в неделю, предпочтительно по крайней мере два раза в неделю, более предпочтительно по крайней мере три раза в неделю и еще более предпочтительно три раза в неделю. Согласно другому варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент или композиция или косметическая композиция вводятся субъекту по крайней мере один раз в день, предпочтительно по крайней мере два раза в день.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, или композиция или косметическая композиция, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, вводятся в течение одной недели, предпочтительно в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель или дольше.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, или композиция или косметическая композиция, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, вводятся в течение периода времени, который продолжается до тех пор, пока не будет достигнут желаемый результат (например, снижение массы тела).

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или

ее фрагмента, или композиции или косметической композиции, заявленных в соответствии с настоящим изобретением, является постоянным, то есть не ограничено по времени.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения суточное количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, составляет от  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут. Согласно другому варианту осуществления изобретения суточное количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, составляет от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут. Согласно другому варианту осуществления изобретения суточное количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, составляет от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения суточное количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, соответствует количеству фрагментов, полученных, приблизительно, из  $1,10^2$  до приблизительно  $1,10^{15}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^5$  до приблизительно  $1,10^{12}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, и еще более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут. Согласно другому варианту осуществления изобретения суточное количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, соответствует количеству фрагментов, полученных, приблизительно, из  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^9$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут. Согласно другому варианту осуществления изобретения суточное количество фрагментов *Akkermansia muciniphila*, которое вводится в течение дня, соответствует количеству фрагментов, полученных, приблизительно, из  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^{10}$  КОЕ/сут, предпочтительно приблизительно от  $1,10^6$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут, более предпочтительно приблизительно от  $1,10^8$  до приблизительно  $1,10^9$  КОЕ/сут.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения указанный субъект не страдает от ожирения. Согласно другому варианту осуществления изобретения указанный субъект имеет избыточный вес.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство также содержат дополнительные пробиотические штаммы или виды, такие как, например, бактериальные пробиотические штаммы или виды; прокариотические пробиотики, но не бактериальной природы; или грибковые штаммы или виды, предпочтительно дрожжевые штаммы или виды. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения указанные дополнительные пробиотические штаммы или виды выбраны из тех, которые в норме присутствуют в кишечнике субъекта, предпочтительно в кишечнике человека, еще более предпочтительно в кишечнике здоровых людей.

Примерами бактериальных пробиотических штаммов или видов, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, относятся (без ограничений указанными): *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Desemzia*, *Coprococcus*, *Collinsella*, *Citrobacter*, *Turcibacter*, *Sutterella*, *Subdoligranulum*, *streptococcus*, *Sporobacter*, *Sporacetigenium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Proteus*, *Propionobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Papillibacter*, *Oscillospira*, *Melissococcus*, *Dorea*, *Dialister*, *Clostridium*, *Cedecea*, *Catenibacterium*, *Butyrivibrio*, *Buttiauxella*, *Bulleidia*, *Bilophila*, *Bacteroides*, *Anaerovorax*, *Anaerostopes*, *Anaerofilum*, *Enterobacteriaceae*, *Fermicutes*, *Atopobium*, *Alistipes*, *Acinetobacter*, *Slackie*, *Shigella*, *Shewanella*, *Serratia*, *Mahella*, *Lachnospira*, *Klebsiella*, *Idiomarina*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Eggerthellia*.

Примерами прокариотических штаммов или видов, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, являются (без ограничений указанными) *Archaea*, *Firmicutes*, *Bacteroides* (такие как, например, *Allistipes*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides splachnicus*, *Bacteroides stercoris*, *Parabacteroides*, *Prevotella ruminicola*, *Porphyromonadaceae* и родственные семейства), *Proteobacteria*, *Betaproteobacteria* (такие как, например, *Aquabacterium* и *Burkholderia*), *Gammaproteobacteria* (такие как, например, *Xanthomonadaceae*), *Actinobacteria* (такие как, например, *Actinomycetaceae* и *Atopobium*), *Fusobacteria*, *Methanobacteria*, *Spirochaetes*, *Fibrobacters*, *Deferribacteres*, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cyanobacteria*, *Methanobrevibacteria*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacteria*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Bacilli* (такие как, например, *Lactobacillus salivarius* и родственные виды, *Aerococcus*, *Granulicatella*, *Streptococcus bovis* и родственные семейства и *Streptococcus intermedius* и родственные семейства), *Clostridium* (такие как, например, *Eubacterium hallii*, *Eubacterium limosum* и родственные семейства) и *Butyrivibrio*.

Примерами грибковых пробиотических штаммов или видов, предпочтительно дрожжевых пробио-

тических штаммов или видов, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, являются (без ограничений указанными) Ascomycetes, Zygomycetes и Deuteromycetes, предпочтительно из групп Aspergillus, Torulopsis, Zygosaccharomyces, Hansenula, Candida, Saccharomyces, Clavispora, Bretanomyces, Pichia, Amylomyces, Zygosaccharomyces, Endomyces, Hyphopichia, Zygosaccharomyces, Kluyveromyces, Mucor, Rhizopus, Yarrowia, Endomyces, Debaryomyces, и/или Penicillium.

Авторы изобретения показывают, что благоприятные эффекты после введения Akkermansia muciniphila являются специфическими для данного бактериального штамма. Кроме того, в Примерах показано, что введение Lactobacillus plantarum WCSF-1 не имеет такого же благоприятного эффекта.

Согласно одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство не содержат бактериальных штаммов Lactobacillus-Enterococcus, Bacteroides и/или Atopobium.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения единственным микробным штаммом или видом, предпочтительно бактериальным штаммом или видом, в составе композиции, фармацевтической композиции, косметической композиции или лекарственного средства является Akkermansia muciniphila.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство состоит из Akkermansia muciniphila.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство состоит исключительно из Akkermansia muciniphila, при этом термин "состоит исключительно из" означает, что Akkermansia muciniphila является единственным микробным штаммом или видом, предпочтительно единственным бактериальным штаммом или видом, в составе композиции, фармацевтической композиции, косметической композиции или лекарственного средства.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения Akkermansia muciniphila или ее фрагмент активирует или ингибирует рост и/или биологическую активность других бактериальных штаммов или видов микрофлоры кишечника.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство дополнительно содержат пребиотик.

Примерами пребиотиков, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, являются, без ограничений указанными, инулин и инулин-подобные фруктаны, олигофруктоза, ксилоза, арабиноза, арабиноксилан, рибоза, галактоза, рамноза, целлобиоза, фруктоза, лактоза, салицин, сахароза, глюкоза, эскулин, твин 80, трегалоза, мальтоза, манноза, меллибиоза, слизь или муцины, раффиноза, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, аминокислоты, спирты и любые комбинации указанных соединений.

Другими неограниченными примерами пребиотиков являются растворимые в воде производные целлюлозы, нерастворимые в воде производные целлюлозы, необработанная овсяная мука, метамуцил, пшеничные хлопья из непросеянной муки с сахаром и солодом, а также любые комбинации указанных соединений.

Примерами растворимых в воде производных целлюлозы являются, без ограничений указанными, метилцеллюлоза, метилэтилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, этил гидроксипропилцеллюлоза, катионная гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и карбоксиметилцеллюлоза.

Akkermansia muciniphila или ее фрагмент, или композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, могут вводиться различными способами. Примерами подходящих путей введения являются, без ограничений указанными, пероральное введение, ректальное введение, введение посредством эзофагогастродуоденоскопии, введения посредством колоноскопии, введение с использованием назогастрального или орогастрального зонда, и подобные способы введения.

В соответствии с настоящим изобретением Akkermansia muciniphila или ее фрагмент, или композиция, или фармацевтическая композиция, или косметическая композиция или лекарственные средства, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, представлены в виде лекарственной формы, адаптированной для перорального введения. В соответствии с первым вариантом осуществления изобретения лекарственная форма, адаптированная для перорального введения, представляет собой твердую лекарственную форму, выбранную из группы, включающей таблетки, пилюли, капсулы, мягкие желатиновые капсулы, таблетки, покрытые сахарной оболочкой, таблетки, диспергируемые в полости рта, или ородисперсные таблетки, шипучие таблетки и другие твердые лекарственные формы. В соответствии со вторым вариантом осуществления изобретения лекарственная форма, адаптированная для перорального введения, представляет собой жидкую лекарственную форму, такую как, например, раствор для питья, липосомальные формы и подобные лекарственные формы.

Согласно одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство, заявленные в соответствии с настоящим изобретением, дополнительно содержат эксципиенты, растворители и/или носители, выбранные с учетом

предполагаемого пути введения. Примерами эксципиентов, растворителей и/или носителей являются, без ограничений указанными, вода, фосфатный буферный раствор, анаэробный фосфатный буферный раствор, бикарбонат натрия, сок, молоко, йогурт, детская молочная смесь, молочный продукт, красители, такие как, например, диоксид титана (E171), диоксид железа (E172) и бриллиантовый черный BN (E151); ароматизаторы; уплотнители, такие как, например, моностеарат глицерола; подсластители; покрывающие агенты, такие как, например, рафинированное рапсовое масло, соевое масло, арахисовое масло, соевый лецитин или рыбный желатин; разбавители, такие как, например, лактоза, моногидратированная лактоза или крахмал; связывающие агенты, такие как, например, повидон, прежелатинизированный крахмал, камеди, сахароза, полиэтиленгликоль (PEG) 4000 или PEG 6000; дезинтегрирующие агенты, такие как, например, микрокристаллическая целлюлоза или натриевый карбоксиметиловый крахмал, такой как, например, натриевый карбоксиметиловый крахмал типа А; либриканы, такие как, например, стеарат магния; агенты, повышающие текучесть, например, коллоидный безводный диоксид кремния и т.д.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство представлены в форме питательной композиции, то есть входят в состав жидкого или твердого пищевого продукта, пищевой или питьевой воды. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство представляют собой пищевой продукт, такой как, например, молочные продукты, молочные напитки, йогурт, фруктовый или овощной сок или его концентрат, порошки, напиток, на основе солода или злаков, злаковый продукт для завтрака, такой как мюсли или хлопья, овощные или фруктовые порошки, злаковые и/или шоколадные батончики, кондитерское изделие, икра, различные типы муки, молоко, смузи, кондитерское изделие, молочный продукт, молочный порошок, восстановленное молоко, кисло-молочный продукт, йогурт, питьевой йогурт, термостатный йогурт, напиток, молочный напиток, шоколад, желе, мороженое, изделия из злаков, восстановленные фруктовые продукты, энергетические батончики, пищевые батончики, батончики-мюсли, различные виды икры, соусы, пасты, молочные продукты, включая йогурты и сыры, напитки, включая молочные и немолочные напитки, спортивные добавки, включая молочные и немолочные спортивные добавки.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство представлено в форме пищевой добавки, добавки в форме напитка, диетической добавки, диетического продукта, продукта лечебного питания или нутрицевтической композиции.

*Akkermansia muciniphila* является строго анаэробной бактерией. Следовательно, в том варианте изобретения, который подразумевает использование жизнеспособных или живых штаммов, необходимо избежать длительного контакта с кислородом. Примерами способов, которые позволяют избежать длительного контакта с кислородом, являются, без ограничений указанными, заморозка бактериальных клеток или упаковка их в герметичный контейнер, и подобные способы.

Авторы настоящего изобретения показали, что ожирение и сопутствующие ему заболевания ассоциированы с повышенной проницаемостью стенки кишечника и нарушением продукции слизи, повреждением эпителиального барьера, повреждением иммунной системы и/или продукции антибактериальных соединений у субъекта; при этом введение *Akkermansia muciniphila* приводит к восстановлению указанных параметров.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменту, предназначенным для уменьшения проницаемости кишечника и/или восстановления нарушенной продукции слизи и/или восстановления эпителиального барьера и/или восстановления иммунной системы и/или пониженной продукции антибактериальных соединений. Другим объектом настоящего изобретения является способ уменьшения проницаемости кишечника и/или восстановления нарушенной продукции слизи и/или восстановления эпителиального барьера и/или восстановления иммунной системы и/или пониженной продукции антибактериальных соединений у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ заключается во введении эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменты субъекту, нуждающемуся в этом.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что введение *Akkermansia muciniphila* регулирует кишечный барьер за счет изменения толщины слизистого слоя и продукции кишечных антимикробных пептидов (таких как, например, RegIIIgamma). Кроме того, авторы изобретения также показали, что *Akkermansia muciniphila* регулирует продукцию ацилглицеролов, которые относятся к семейству эндоканнабиноидов, участвующих в контроле воспалительных реакций, кишечного барьера и секреции кишечных пептидов (GLP-1 и GLP-2). GLP-1 и GLP-2 имеют множество функций, включая улучшение сигнального пути инсулина, снижение воспалительной реакции и стимуляцию чувства насыщения.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменту, предназначенным для регулирования барьерной функции кишечника, а также к способу регулирования барьерной функции кишечника, который заключается во введении эффективного или косметически эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно одному варианту осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент регули-

рует толщину слизистого слоя (толщина слизистого слоя может быть снижена у людей с ожирением и другими метаболическими нарушениями). Согласно другому варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента индуцирует продукцию кишечных антимикробных пептидов, таких как, например, RegIIIgamma. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента индуцирует продукцию соединений из семейства эндоканнабиноидов, таких как, например, 2-олеоилглицерол, 2-пальмитоилглицерол и 2-арахидоноилглицерол. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента регулирует обновление слизи.

Другой объект настоящего изобретения касается *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента, предназначенных для использования в лечении метаболической дисфункции, ассоциированной метаболическим нарушением или вызванной им. Еще одним объектом настоящего изобретения, таким образом, является способ лечения метаболической дисфункции, ассоциированной метаболическим нарушением или вызванной им, при этом указанный способ заключается во введении эффективного количества или косметически эффективного количества, *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом.

Авторы настоящего изобретения также показали, что введение *Akkermansia muciniphila* регулирует накопление жира и метаболизм жировой ткани. Таким образом, другим объектом настоящего изобретения является *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмент, предназначенные для использования для регулирования накопления жира и метаболизма жировой ткани. Другим объектом настоящего изобретения также является способ регулирования накопления жира и метаболизма жировой ткани, заключающийся во введении эффективного количества или косметически эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно одному варианту осуществления изобретения указанное регулирование не подразумевает каких-либо изменений в режиме питания. Согласно одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента устраняет метаболическую эндотоксемию. Согласно другому варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента приводит к снижению массы тела. Согласно другому варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента соответственно повышает экспрессию мРНК во время дифференцировки адипоцитов и окисления липидов предпочтительно без влияния на липогенез.

Авторы настоящего изобретения показали, что введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента регулирует метаболизм жировой ткани и гомеостаз глюкозы. Настоящее изобретение, таким образом, также относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменту, предназначенным для использования в регулировании метаболизма жировой ткани и гомеостаза глюкозы; а также к способу регулирования метаболизма жировой ткани и гомеостаза глюкозы, который заключается во введении эффективного количества или косметически эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента отменяет индуцированную диетой гипергликемию натощак. Согласно другому варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента, таким образом, индуцирует восстановление по крайней мере 10%, предпочтительно по крайней мере 30%, более предпочтительно по крайней мере 40%, экспрессии печеночной глюкозо-6-фосфатазы. Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента, таким образом, индуцирует восстановление индекса резистентности к инсулину. Согласно одному варианту осуществления изобретения восстановление индекса резистентности к инсулину происходит по крайней мере на 5%, предпочтительно по крайней мере на 10%, более предпочтительно по крайней мере на 15%.

Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, что введение *Akkermansia muciniphila* приводит к нормализации субпопуляции CD11c макрофагов жировой ткани. Количество клеток из указанной популяции макрофагов увеличивается при метаболических нарушениях, таких как, например, ожирение и сахарный диабет 2 типа, и является отличительным признаком воспаления, связанного с указанными метаболическими нарушениями. Таким образом, настоящее изобретение также относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменту, предназначенным для лечения воспаления, предпочтительно неспецифического воспаления, вызванного метаболическими нарушениями или ассоциированного с ними; а также к способу лечения воспаления, ассоциированного с метаболическими нарушениями, при этом указанный способ заключается во введении эффективного количества или косметически эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента снижает количество CD11c макрофагов в жировой ткани.

Наконец, авторы изобретения показали, что введение *Akkermansia muciniphila* снижает уровень холестерина у мышей, получавших диету, с высоким содержанием жиров. Таким образом, настоящее изобретение также относится к *Akkermansia muciniphila* или ее фрагменту, предназначенным для снижения уровня холестерина в плазме; а также к способу снижения уровня холестерина в плазме, который заключается во введении эффективного количества или косметически эффективного количества *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту, нуждающемуся в этом.

Согласно одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту не оказывает влияния на режим питания указанного субъекта.

Согласно ещё одному варианту осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту приводит к усилению основного обмена у указанного субъекта предпочтительно без влияния на режим питания указанного субъекта.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к способу усиления основного обмена у субъекта, при этом указанный способ заключается во введении *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента, или композиции, или фармацевтической композиции, или косметической композиции или лекарственного средства в соответствии с настоящим изобретением субъекту предпочтительно в терапевтически или косметически эффективном количестве. Предпочтительно способ в соответствии с настоящим изобретением не подразумевает каких-либо изменений в режиме питания указанного субъекта. Согласно одному варианту осуществления изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением усиливает основной обмен, что приводит к существенной потере веса у субъекта, и, следовательно, излечиванию субъекта от метаболических нарушений, таких как, например, метаболические нарушения, ассоциированные с ожирением.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения введение *Akkermansia muciniphila* или ее фрагмента субъекту усиливает чувство насыщения у субъекта. Таким образом, в соответствии с данным вариантом изобретения способствует усилению чувства насыщения у субъекта, что индуцирует потерю веса у субъекта и приводит к излечиванию субъекта от метаболических нарушений, таких как, например, метаболические нарушения, ассоциированные с ожирением.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется представленными ниже примерами.

### Примеры

Материалы и методы.

Мыши.

Ob/ob эксперимент.

Исследование ob/ob против худых: 6-недельных ob/ob мышей (n=5/группа) (C57BL/6 background, Jackson-Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) содержали в контролируемых условиях (12-часовой цикл смены дня и ночи, свет выключали в 6 вечера) группами по двое/трое животных в клетке со свободным доступом к еде и воде. Мыши получали контрольную диету (A04, Villemoisson-sur-Orge, France) в течение 16 недель. Содержимое слепой кишки собирали, погружали в жидкий азот и хранили при -80°C, для последующего исследования *Akkermansia muciniphila*.

Ob/ob эксперимент с пребиотиками.

6-недельных ob/ob мышей (n=10/группа) (C57BL/6 background, Jackson-Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) содержали в контролируемых условиях (12-часовой цикл смены дня и ночи, свет выключали в 6 вечера) группами по двое животных в клетке со свободным доступом к еде и воде. Мыши получали контрольную диету (Ob-CT) (A04, Villemoisson-sur-Orge, France) или контрольную диету, обогащенную пребиотиками, такими как олигофруктоза (Ob-Pre) (Orafti, Tienen, Belgium) в течение 5 недель, как описано ранее (Everard et al. Diabetes 60, 2775-2786, 2011). Этот помет мышей был ранее описан у Everard et al. (Everard et al. Diabetes 60, 2775-2786, 2011).

Эксперимент с диетой с повышенным содержанием жиров и пребиотиками.

Помет 10-недельных мышей линии C57BL/6J (40 мышей, n=10/группа) (Charles River, Brussels, Belgium) содержали группами по пять животных в клетке со свободным доступом к еде и воде. Мыши получали контрольную диету (CT) (A04, Villemoisson-sur-Orge, France) или контрольную диету и лечение пребиотиками, такими как олигофруктоза (Orafti, Tienen, Belgium) (0,3 мг каждому животному в день), которые добавляли в водопроводную воду (CT-Pre), или диету с высоким содержанием жиров (HF) (60% жиров и 20% углеводов (ккал/100 г), D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA) или HF диету и лечение олигофруктозой (0,3 мг каждому животному в день), которую добавляли в водопроводную воду (HF-Pre). Лечение продолжалось в течение 8 недель.

Эксперимент с HFD и *Akkermansia muciniphila*.

Помет 10-недельных мышей линии C57BL/6J (40 мышей, n=10/группа) (Charles River, Brussels, Belgium) содержали группами по двое животных в клетке со свободным доступом к еде и воде. Мыши получали контрольную диету (CT) (AIN93Mi; Research diet, New Brunswick, NJ, USA) или диету с высоким содержанием жиров (HF) (60% жиров и 20% углеводов (ккал/100 г), D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA). Мышам принудительно перорально вводили *Akkermansia muciniphila* в дозе  $2,10^8$  КОЕ/0,2 мл, суспендированной в стерильном анаэробном фосфатном буферном солевом растворе (CT-Akk и HF-Akk), при этом животные из контрольной группы получали принудительное пероральное введение эквивалентного объема стерильного анаэробного фосфатного буферного солевого раствора (CT и HF). Лечение продолжалось в течение 4 недель.

*A. muciniphila* Muc<sup>T</sup> (ATTC VAA-835) выращивали в анаэробных условиях в основной среде на основе муцина, как описано ранее (Derrien et al. Int J Syst Evol Microbiol 54, 1469-1476 (2004)), затем отмывали и суспендировали в анаэробном фосфатном буферном солевом растворе, содержащим 25% (об/об) глицерола, до конечной концентрации  $1,10^{10}$  КОЕ/мл.

Лечение живыми *Akkermansia muciniphila* в сочетании с HFD против лечения *Akkermansia muciniphila*, инактивированными теплом, и против лечения *Lactobacillus plantarum* WCFS1.

Помет 10-недельных мышей линии C57BL/6J (40 мышей, n=8/группа) (Charles River, Brussels, Belgium) содержали группами по двое животных в клетке со свободным доступом к еде и воде. Мыши получали контрольную диету (CT) (AIN93Mi; Research diet, New Brunswick, NJ, USA) или диету с высоким содержанием жиров (HF) (60% жиров и 20% углеводов (ккал/100 г), D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA). Мышам принудительно перорально вводили *Akkermansia muciniphila* в дозе  $2,10^8$  КОЕ/0,2 мл, суспендированной в стерильном анаэробном фосфатном буферном солевом растворе. *A. muciniphila* инактивировали/убивали теплом путем автоклавирования (15 мин, 121°C, 225 кПа). Проверка жизнеспособности путем культивирования в муцин-содержащей среде подтвердило отсутствие жизнеспособных клеток. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 выращивали в анаэробных условиях в MRS среде (Difco Lactobacilli MRS бульон; BD), отмывали, концентрировали и поступали таким же образом, как и с культурой *A. muciniphila*. Двум контрольным группам (CT и HF) ежедневно перорально принудительно вводили эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS, содержащего аналогичную конечную концентрацию глицерола (2,5%) (ослабленного добавлением одной капли 100 мМ цитрата титана) в течение 4-х недель, как и лечебным группам.

Потребление воды и пищи регистрировали один раз в неделю. Композицию тела оценивали при помощи 7,5 МГц пространственно-временной ядерной магнитно-резонансной томографии (TD-NMR) (LF50 миниспектр, Bruker, Rheinstetten, Germany).

Все эксперименты на мышах осуществлялись в соответствии с руководством местного этического комитета и с его одобрения. Условия содержания были специфицированы в соответствии с бельгийским законом от 6 апреля 2010 г., касающимся охраны лабораторных животных (номер соглашения LA1230314).

Получение образцов тканей.

Животным перед обескровливанием и взятием образцов тканей давали общий наркоз изофлураном (Forene®, Abbott, Queenborough, Kent, England), после которого умерщвляли путем разрыва шейных позвонков. Жировые депо (эпидидимальное, подкожное и мезентериальное) и печень аккуратно иссекали и взвешивали; путем суммирования масс трех жировых депо рассчитывали индекс ожирения. Сегменты кишечника (подвздошная кишка, слепая кишка и толстая кишка), а также содержимое слепой кишки и жировые ткани погружали в жидкий азот и хранили при -80°C для дополнительного анализа.

Толщина слизистого слоя.

Проксимальные сегменты толстого кишечника незамедлительно извлекали и помещали в раствор Карнуа (этанол-уксусная кислота-хлороформ, 6/3/1, об./об./об.) на 2 ч при 4°C. Затем образцы погружали в 100% этанол на 24 ч перед заливкой в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали альциановым голубым. Минимум 20 различных измерений осуществляли перпендикулярно внутреннему слизистому слою на поле зрения; измерения осуществляли в режиме, слепом для исследователя в отношении экспериментальных групп. Для каждого образца кишечника исследовали от 5 до 19 полей зрения, выбранных случайным образом, всего провели 2146 измерений с использованием анализатора изображений (Motic-image, Plus 2.0ML, Motic, China).

Получение РНК и количественная ПЦР в реальном времени.

Общую РНК выделяли из тканей при помощи реагента TriPure (Roche). Количественный анализ и анализ целостности общей РНК осуществляли путем анализа 1 мкл каждого образца на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent).

кДНК получали путем обратной транскрипции 1 мкг общей РНК с использованием набора для системы обратной транскрипции (Promega, Leiden, The Netherlands). ПЦР в реальном времени осуществляли при помощи системы для ПЦР в реальном времени StepOnePlus™ и программного обеспечения (Applied Biosystems, Den Ijssel, The Netherlands) с использованием Mesa Fast qPCR™ (Eurogentec, Seraing, Belgium) для определения реакции согласно инструкциям производителя. В качестве гена домашнего хозяйства был выбран ген RPL19. Все образцы пропускали в дубликатах на одном 96-луночном реакционном планшете, а данные анализировали с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Идентичность и чистоту продукта амплификации проверяли посредством анализа кривой плавления, который осуществляли по завершении амплификации. Праймерные последовательности для мышиных генов, представляющих интерес, представлены ниже в таблице.



Выделение ДНК из образцов содержимого слепой кишки мышей.

Содержимое слепой кишки мышей собирали посмертно и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Метагеномную ДНК экстрагировали из содержимого слепой кишки при помощи мини-набора QIAamp-DNA (Qiagen, Hilden, Germany) согласно инструкциям производителя.

Измерение уровня кишечных эндоканнабиноидов.

Ткани подвздошной кишки гомогенизировали в  $\text{CHCl}_3$  (10 мл) и добавляли дейтерированные стандарты. Кривые экстракции и калибровки получали, как описано ранее (Muccioli et al., *Mol Syst Biol*, 2010, 6, 392), данные нормализовали по весу образцов тканей.

Количественная ПЦР: праймеры и условия.

Праймеры и зонды, используемые для определения *Akkermansia muciniphila*, были основаны на 168 рРНК генных последовательностей: F-*Akkermansia muciniphila* CCTGCGGTTGGCTTCAGAT (SEQ ID NO: 29), R-*Akkermansia muciniphila* CAGCACGTGAAGGTGGGGAC (SEQ ID NO: 30). ПЦР в реальном времени осуществляли при помощи системы для ПЦР в реальном времени StepOnePlus™ и программного обеспечения (Applied Biosystems, Den Ijessel, The Netherlands) с использованием Mesa Fast qPCR™ (Eurogentec, Seraing, Belgium) для определения реакции согласно инструкциям производителя. Каждое исследование осуществляли в дубликate в одной серии. Пороговый цикл каждого образца затем сравнивали со стандартной кривой (полученной в трипликate), полученной путем ослабления геномной ДНК (пятикратное серийное разведение) (DSMZ, Braunschweig, Germany). Данные представлены как Log бактерий/г содержимого слепой кишки.

MITC-чип: ПЦР праймеры и условия.

ДНК, экстрагированную из содержимого слепой кишки, анализировали при помощи чипа для кишечного тракта мышей (MITChip, от англ. Mouse Intestinal Tract Chip), полигенетической микропанели, включающей 3,580 различных олигонуклеотидных зондов, направленных к двум гипервариабельным участкам 16S рРНК гена (участки V1 и V6). Анализ на MITC-чипе осуществляли, как описано ранее (Everard et al. *Diabetes* 60, 2775-2786 (2011); Geurts et al., *Front Microbiol.* 2, 149 (2011)). Вкратце, анализ микрофлоры осуществляли на уровне 2, что соответствует уровню рода. Мультивариантный анализ осуществляли при помощи репрезентативного анализа различий (RDA, от англ. Representational Difference Analysis), который включен в программное обеспечение CANOCO 4,5 (Biometris, Wageningen, The Netherlands), на средней интенсивности сигналов для 99 бактериальных групп (уровни 2). Все изменения окружающей среды трансформировали как  $\log(1+X)$ . Критерий перестановок Монте-Карло, основанный на 999 случайных перестановок, использовали для проверки значимости. Величины  $P < 0,05$  считались значимыми.

Измерение уровня холестерина в плазме.

Уровень холестерина в образцах плазмы анализировали путем измерения холестерина, который оставался после ферментативного гидролиза эфира холестерина, с использованием промышленного набора (DiaSys, Condom, France).

Статистический анализ.

Данные представлены как среднее  $\pm$  среднеквадратичное отклонение. Различия между двумя группами оценивали при помощи непарного двустороннего *i*-критерия Стьюдента. Набор данных, включающий более чем две группы, анализировали при помощи ANOVA с последующими апостериорными тестами Ньюмена-Кейлса. Корреляции анализировали при помощи корреляции Пирсона. Данные, обозначенные разными верхними индексами, являются по существу ( $P < 0,05$ ) согласно ретроспективному однонаправленному статистическому анализу ANOVA. Данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism 5,00 версии для Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Результаты считались статистически значимыми, когда  $P < 0,05$ .

Результаты.

Авторы изобретения обнаружили, что численность *A. muciniphila* была в 300 раз ниже у дефицитных по лептину мышей с ожирением, чем у их худых собратьев (фиг. 1a). Соответственно авторы изобретения также обнаружили 100-кратное снижение численности бактерий у мышей на диете с высоким содержанием жиров (HF) (фиг. 1c). В обеих моделях введение пребиотиков полностью восстанавливало численность *A. muciniphila* (фиг. 1b, c). У мышей на HF-диете пребиотики способствовали исчезновению метаболической эндотоксемии (фиг. 1d), нормализации субпопуляции CD11c макрофагов жировой ткани (фиг. 1c) и снижению массы жировой ткани (фиг. 1g и 3b). Полученные результаты существенным образом и обратно пропорционально коррелировали с *A. muciniphila* (фиг. 1f и 3a, c). Тем не менее, остается необходимым продемонстрировать, насколько молекулярные механизмы, которые лежат в основе дебюта указанных заболеваний, базируются на дефиците *A. muciniphila* и, в противоположность этому, обусловлено ли улучшение состояния после введения пребиотиков восстановлением высокой численности указанной бактерии.

Для решения указанной задачи *A. muciniphila* вводили перорально контрольным мышам или мышам на HF диете в течение четырех недель, таким образом увеличивая численность *A. muciniphila* (фиг. 4a, b). При помощи филогенетической микропанели (MrfChip) (Everard et al. *Diabetes* 60, 2775-2786

(2011); Geurts et al. *Front Microbiol.* 2, 149 (2011)) авторы изобретения обнаружили, что и HF-диета, и колонизация *A. muciniphila* существенно влияли на комплексные взаимоотношения между бактериями в составе кишечной микрофлоры, что также подтверждалось при помощи анализа основных компонентов (PCA)(фиг. 2a) и относительными изменениями различных таксонов.

Авторы изобретения обнаружили, что введение *A. muciniphila* способствует исчезновению обусловленной диетой метаболической эндотоксемии и нормализует уровень CD11c маркера жировой ткани (фиг. 2b, c, e и 5a) без каких-либо изменений пищевого рациона (фиг. 5b). Кроме того, лечение *A. muciniphila* приводило к снижению массы тела и улучшало общую композицию тела (то есть соотношение жировых/нежировых тканей) (фиг. 5a и 5d). Соответственно авторы изобретения предположили, что *A. muciniphila* должна оказывать влияние на метаболизм жировой ткани, и обнаружили, что у мышей на HF диете, *A. muciniphila* увеличивала экспрессию мРНК маркеров дифференцировки адипоцитов и окисления липидов без влияния на липогенез (фиг. 2f). Все вместе указанные данные позволяют дополнительно предположить, что *A. muciniphila* контролирует запас жира в организме и метаболизм жировой ткани.

Далее авторы изобретения обнаружили, что колонизация *A. muciniphila* полностью подавляет индуцированную диетой гипергликемию натошак за счет механизма, ассоциированного с 40% снижением экспрессии печеночной глюкозо-6-фосфатазы (фиг. 6a, b), что подразумевает снижение глюконеогенеза. Необходимо отметить, индекс резистентности к инсулину также снижался после лечения (фиг. 2d). Все вместе полученные результаты позволяют предположить, что *A. muciniphila* участвует в регуляции метаболизма жировой ткани и гомеостазе глюкозы. Одно объяснение заключается в том, что *A. muciniphila* играет ключевую роль на различных уровнях регуляции кишечной барьерной функции. Последние данные позволяют предположить, что кишечные клетки также участвуют в поддержании кишечного барьера за счет секреции антимикробных пептидов, формируя, таким образом, микробные сообщества (Pott et al., *EMBO Rep.* 2012).

Для того чтобы лучше понять, каким образом *A. muciniphila* влияет на барьерную функцию кишечника, авторы изобретения измерили экспрессию Paneth и антибактериальных маркеров эпителиальных клеток в подвздошной кишке. Было обнаружено, что *A. muciniphila* увеличивала экспрессию Reg3g (фактора регенерации 3-гамма, выделенного из островков, Reglly) при контрольной диете, однако указанный эффект не наблюдался у мышей на HF диете (фиг. 7a). Экспрессия Pla2g2a, Defa не отличалась между группами, в то время как экспрессия Lyz1 имела тенденцию к снижению после введения бактерий (фиг. 7b, c, d). IgA синтезируются в просвете кишечника и, как известно, ограничивают проникновение бактерий через слизистую оболочку (Vaishnava, S., et al., *Science* 334, 255-258, 2011); авторы изобретения обнаружили, что уровни IgA в фекалиях не изменялись после лечения (фиг. 7e). Таким образом, можно сделать предположение, что *A. muciniphila* контролирует барьерную функцию кишечника посредством других механизмов, включающих вовлечение в передачу сигнала эпителиальными клетками (Dertien et al., *Front Microbiol* 2, 166, 2011). Авторы изобретения не могли исключить, что система эндоканнабиноидов играет ключевую роль в данном вопросе; затем было показано, что лечение *A. muciniphila* приводит к увеличению уровня 2-олеоилглицерола, 2-пальмитоилглицерола и 2-арахидоноилглицерола в кишечнике (фиг. 2g). Важно, что было показано, что 2-олеоилглицерол стимулирует высвобождение глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1) из кишечных L-клеток, что позволяет предположить, что и GLP-1 и GLP-2 должны улучшать барьерную функцию кишечника и способствовать гомеостазу глюкозы (Hansen, et al., *J Clin Endocrinol Metab* 96, E1409-1417, 2011). Кроме того, 2-арахидоноилглицерол снижает проницаемость кишечной стенки, а 2-пальмитоилглицерол (Alhouayek et al. *FASEB J* 25, 2711-2721, 2011; Ben-Shabat, et al., *Eur. J. Pharmacol.* 353, 23-31, 1998) потенцирует противовоспалительное действие 2-арахидоноилглицерола. Таким образом, представляется вероятным, что повышение уровня указанных трех эндоканнабиноидов, наблюдаемое после лечения *A. muciniphila*, обусловлено тем, что колонизация *A. muciniphila* является молекулярным событием, связывающим указанные метаболические элементы.

Последние доказательства подтверждают, что взаимодействия между кишечной микрофлорой и слизистым слоем представляют собой динамическую систему, оказывающую влияние на биологию слизистого барьера (Belzer et al., *ISME J* 6, 1449-1458, 2012; Johansson et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 108 Suppl 1, 4659-4665, 2011). Авторы изобретения обнаружили влияние колонизации *A. muciniphila* на толщину внутреннего слизистого слоя. Примечательно, что авторы изобретения обнаружили, что у мышей на HF диете толщина слизистого слоя была на 46% меньше (фиг. 2h), при этом колонизация *A. muciniphila* нейтрализует это изменение (фиг. 2h). Все вместе указанные новые открытия поддерживают предположение о том, что присутствие *A. muciniphila* в слизистом слое является критическим механизмом, регулирующим обмен слизи (Belzer et al., *ISME J* 6, 1449-1458, 2012). Далее авторы изобретения изучили, влияет ли *A. muciniphila* также на экспрессию Reg3g в эпителиальных клетках толстого кишечника. Удивительно, экспрессия Reg3g снижалась почти на 50% у животных на HF-диете. Введение *A. muciniphila* полностью подавляло указанный эффект и даже увеличивало экспрессию RegSg на 400%, по сравнению с экспрессией у мышей на HF-диете (фиг. 2i). Таким образом, это связано с колонизацией *A. muciniphila* толстого кишечника, но не подвздошной кишки, а также с фундаментальным иммунным механизмом, посредством которого Reglly поддерживает симбиоз между организмом-хозяином и бактериями и регулирует пространственные взаимодействия между микрофлорой и хозяином (Vaishnava, S., et al., *Science* 334, 255-258, 2011). Важно отметить, что у

безмикробных мышей *A. muciniphila* индуцирует генную экспрессию в толстом кишечнике так же, как и в подвздошной кишке (Derrien et al., Front Microbiol 2, 166, 2011).

Чтобы продемонстрировать, должна ли *A. muciniphila* быть жизнеспособной для того, чтобы оказывать свое метаболическое действие, авторы изобретения сравнили влияние введения живых *A. muciniphila* ( $2,10^8$  бактериальных клеток, суспендированных в 200 мкл стерильного анаэробного фосфатного буферного солевого раствора (PBS)) и инактивированных/ убитых *A. muciniphila* (автоклавирование, 15 мин, 121°C, 225 кПа). Было показано, что живые и метаболически активные *A. muciniphila* подавляли индуцированную диетой метаболическую эндотоксемию, прирост жировой ткани и изменяли метаболизм жировой ткани (фиг. 8a, b, d и 9a) до уровня, который наблюдался в первой серии экспериментов. Важно, что указанные эффекты не наблюдались после введения инактивированных теплом *A. muciniphila* (фиг. 8a, b, d и 9a). Кроме того, авторы изобретения показали, что метаболически активная *A. muciniphila* существенно снижала уровень глюкозы в плазме после перорального теста на толерантность к глюкозе (фиг. 8C), в то время как *A. muciniphila*, инактивированная теплом, обладала такой же нетолерантностью к глюкозе, какая наблюдалась у мышей на HF-диете (фиг. 8C). Наконец, авторы изобретения подтвердили, что метаболически активная *A. muciniphila* восстанавливала толщину слизистого слоя у мышей на HF-диете, в то время как инактивированная теплом *A. muciniphila* на улучшала состояние слизистого слоя по сравнению с HF (фиг. 8E и F). Следует отметить, что авторы изобретения обнаружили, что *A. muciniphila*, выделенная из содержимого слепой и толстой кишок мышей, получавших лечение *A. muciniphila*, была в 100 раз метаболически активнее, чем бактерия у мышей на HF диете или получавших *A. muciniphila*, инактивированную теплом (HF-Akk:  $9,5 \pm 1,02 \text{ Log}_{10}$  клеток/мг содержимого, HF и HF-K-Akk:  $6,8 \pm 0,51 \text{ Log}_{10}$  клеток/мг содержимого;  $P = 0,0059$ ), что подтверждает жизнеспособность *A. muciniphila* после перорального введения.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что индуцированное HF диетой ожирение ассоциировано с изменениями композиции кишечной микрофлоры, но при этом, лечение не оказывало влияния на концентрацию антимикробных пептидов. В противоположность этому, экспрессия Reg3g в эпителиальных клетках толстого кишечника существенно снижалась, приблизительно на 50% у мышей на HF диете и получавших лечение *A. muciniphila*, инактивированной теплом, в то время как введение метаболически активной *A. muciniphila* полностью нивелировало указанный эффект и увеличивало экспрессию Reg3g у мышей на HF диете (фиг. 9B).

Затем авторы изобретения решили изучить, остается ли введение *A. muciniphila* таким же эффективным в течение пролонгированной диеты с высоким содержанием жиров (8 недель) и является ли введение *A. muciniphila* 3 раза в неделю (вместо ежедневного введения) достаточным для профилактики развития индуцированного диетой ожирения. Композиции и дозы *A. muciniphila* оставались теми же, которые использовались в протоколе, подразумевавшем ежедневное принудительное пероральное введение метаболически инактивированной *A. muciniphila*.

Было показано, что введение *A. muciniphila* снижало прибавку массы тела (фиг. 10A) приблизительно на 30%, несмотря на то что мыши получали диету с высоким содержанием жиров, при этом не отмечалось потери жиров с фекалиями и изменений в пищевом поведении. Также было отмечено связанное с лечением уменьшение массы жировой ткани (подкожной жировой ткани) приблизительно на 45% (фиг. 10B) и уменьшение массы висцеральных жировых депо (мезентериального и эпидидимального), приблизительно на 35% (фиг. 10C). Таким образом, указанный набор данных поддерживает предположение о том, что введение *A. muciniphila* сохраняет свою эффективность в течение продолжительного периода времени, и введение *A. muciniphila* 3 раза в неделю вместо ежедневного введения также является эффективным и достаточным.

Для того чтобы подтвердить, что указанные результаты обусловлены специфическим действием *A. muciniphila*, авторы изобретения осуществляли лечение мышей на HF диете пробиотиком (то есть *Lactobacillus plantarum* WCFS1). Было показано, что введение *Lactobacillus plantarum* не оказывало влияния на прирост жировой ткани, метаболизм жировой ткани, толщину слизистого слоя, экспрессию мРНК Reg3g в кишечнике и метаболическую эндотоксемию (фиг. 12A-E).

Гиперхолестеринемия, как известно, является ключевым фактором в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Авторы изобретения изучили влияние лечения *A. muciniphila* на уровень холестерина в плазме у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров. Как показано на фиг. 11, лечение *A. muciniphila* приводило к существенному снижению (приблизительно 15%) уровня холестерина в плазме, что вместе с эффектом в отношении LPS и других параметров метаболизма снижает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

В целом, открытия, сделанные авторами изобретения, не только помогают существенно лучше понять механизмы, посредством которых *A. muciniphila* регулирует перекрестные взаимодействия между организмом хозяина и кишечной микрофлорой, но и являются основой для разработки новых способов лечения с использованием указанного микроорганизма, колонизирующего слизистую оболочку кишечника человека; данные способы предназначены для профилактики или лечения ожирения и ассоциированных с ним метаболических нарушений, таких как, например, гиперхолестеринемия.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение *Akkermansia muciniphila* для лечения метаболического нарушения у субъекта, выбранного из группы, включающей метаболический синдром, ожирение, заболевания, ассоциированные с инсулиновой недостаточностью или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (в частности, сахарный диабет 2-го типа), нарушение толерантности к глюкозе, нарушенный метаболизм липидов, атеросклероз, гипертония, сердечная патология, инфаркт, неалкогольная жировая болезнь печени, гипергликемия, жировой гепатоз, дислипидемия, в том числе атерогенная дислипидемия, дисфункция иммунной системы, ассоциированная с избыточным весом и ожирением, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина и повышенный уровень триглицеридов.

2. Применение *Akkermansia muciniphila* по п.1, при этом указанным метаболическим нарушением является ожирение.

3. Применение *Akkermansia muciniphila* для повышения основного обмена у субъекта.

4. Применение *Akkermansia muciniphila* для усиления чувства насыщения у субъекта.

5. Способ лечения метаболического нарушения у субъекта, отличающийся тем, что вводят *Akkermansia muciniphila* субъекту, нуждающемуся в этом.

6. Способ по п.5, где *Akkermansia muciniphila* вводят перорально.

7. Способ по п.5 или 6, где количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводят субъекту, составляет от  $1,10^4$  до около  $1,10^{12}$  КОЕ, предпочтительно от  $1,10^5$  до около  $1,10^{11}$  КОЕ и более предпочтительно от около  $1,10^6$  до около  $1,10^{10}$  КОЕ.

8. Способ по любому из пп.5-7, где *Akkermansia muciniphila* вводят по крайней мере три раза в неделю.

9. Способ по любому из пп.5-8, где *Akkermansia muciniphila* вводят совместно с другим пробиотическим штаммом и/или вместе с одним или более пребиотиком.

10. Пищевая композиция для увеличения основного обмена у субъекта или для усиления чувства насыщения у субъекта, включающая *Akkermansia muciniphila*.

11. Способ увеличения основного обмена у субъекта или усиления чувства насыщения у субъекта, включающий введение перорально композиции по п.10.

12. Фармацевтическая композиция для лечения метаболического нарушения или для увеличения основного обмена у субъекта, или для усиления чувства насыщения у субъекта, включающая *Akkermansia muciniphila* совместно с фармацевтически приемлемым носителем.

13. Применение *Akkermansia muciniphila* для стимуляции потери веса у субъекта, нуждающегося в этом.

14. Пищевая композиция, содержащая *Akkermansia muciniphila*, предназначенная для стимуляции потери веса у субъекта, нуждающегося в этом.

15. Применение *Akkermansia muciniphila* для восстановления эпителиального барьера.

16. Применение *Akkermansia muciniphila* для восстановления барьерной функции пищеварительного тракта.

17. Применение по пп.13, 15 или 16, где *Akkermansia muciniphila* находится в составе пищевой добавки, напитка, диетической добавки, пищевого продукта, лечебного питания или нутрицевтика.

18. Пищевая композиция по п.10 или 14, представляющая собой пищевую добавку, напиток, диетическую добавку, пищевой продукт, лечебное питание или нутрицевтик.

19. Способ стимуляции потери веса, включающий введение *Akkermansia muciniphila* субъекту.

20. Способ восстановления эпителиального барьера, включающий введение *Akkermansia muciniphila* субъекту.

21. Способ восстановления барьерной функции пищеварительного тракта, включающий введение *Akkermansia muciniphila* субъекту.

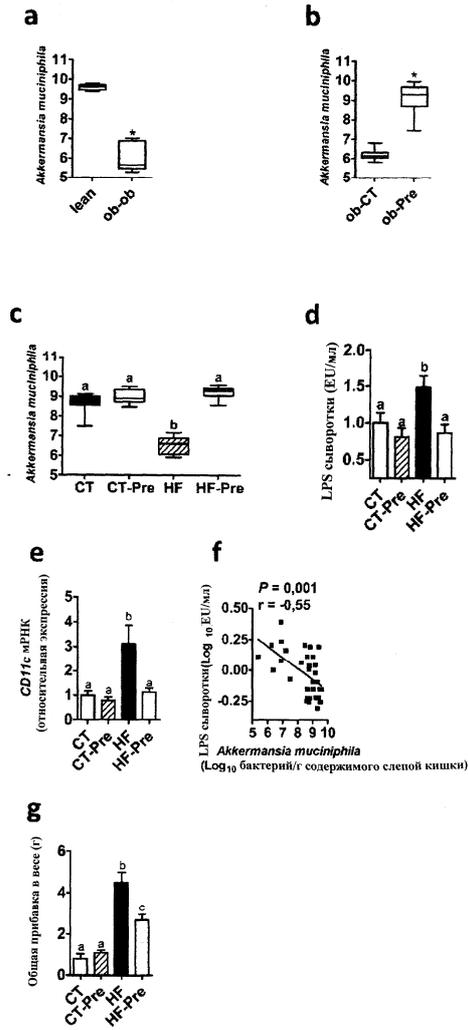
22. Способ по пп.19-21, где *Akkermansia muciniphila* вводят перорально.

23. Способ по пп.19-22, где количество *Akkermansia muciniphila*, которое вводят субъекту, составляет от  $1,10^4$  до около  $1,10^{12}$  КОЕ, предпочтительно от  $1,10^5$  до около  $1,10^{11}$  КОЕ и более предпочтительно от около  $1,10^6$  до около  $1,10^{10}$  КОЕ.

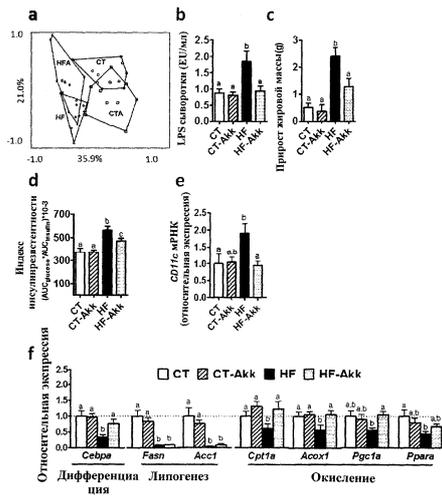
24. Способ по любому из пп.19-23, где *Akkermansia muciniphila* вводят по крайней мере три раза в неделю.

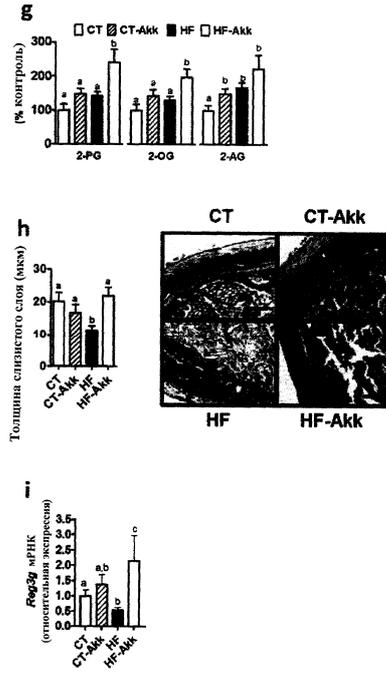
25. Способ по пп.20-26, где *Akkermansia muciniphila* вводят совместно с другим пробиотическим штаммом и/или вместе с одним или более пребиотиком.

26. Способ по п.25, где пребиотиком является инулин и инулин-подобные фруктаны, олигофруктоза, ксилоза, арабиноза, арабиноксилан, рибоза, галактоза, рамноза, целлобиоза, фруктоза, лактоза, салицин, сахароза, глюкоза, эскулин, твин 80, трегалоза, мальтоза, манноза, меллибиоза, слизь или муцины, раффиноза, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, аминокислоты, спирты и любые комбинации указанных соединений, предпочтительно инулин, инулин-подобные фруктаны или олигофруктоза.

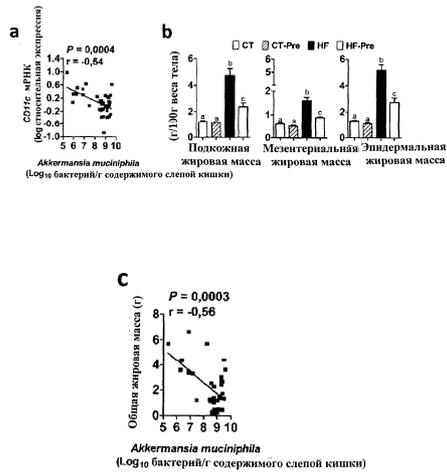


Фиг. 1

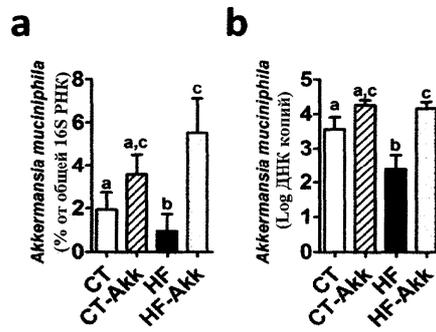




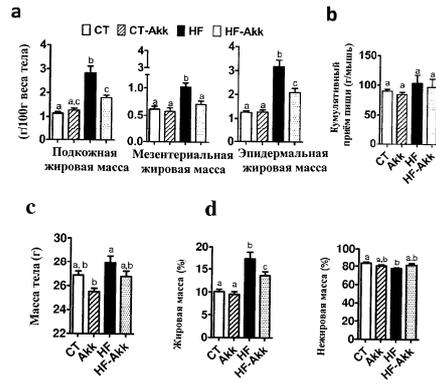
Фиг. 2



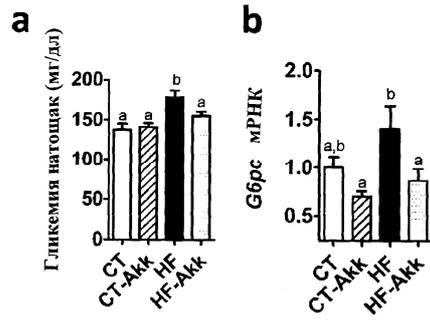
Фиг. 3



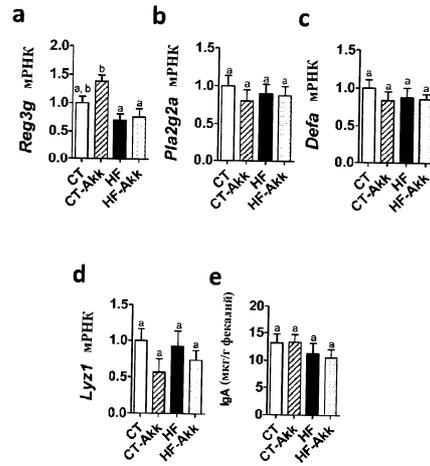
Фиг. 4



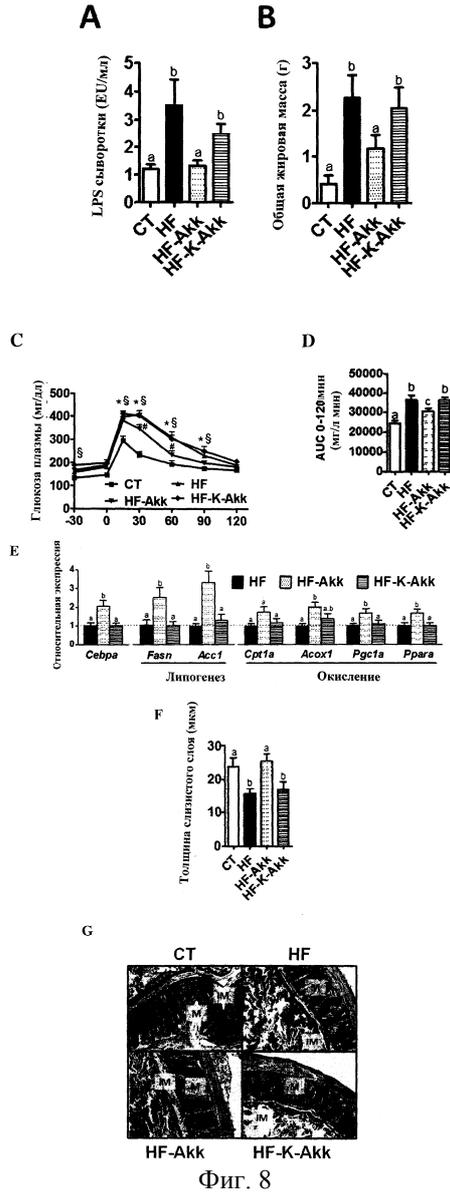
Фиг. 5



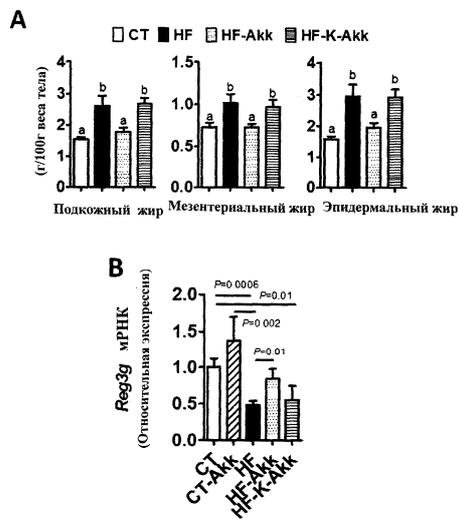
Фиг. 6



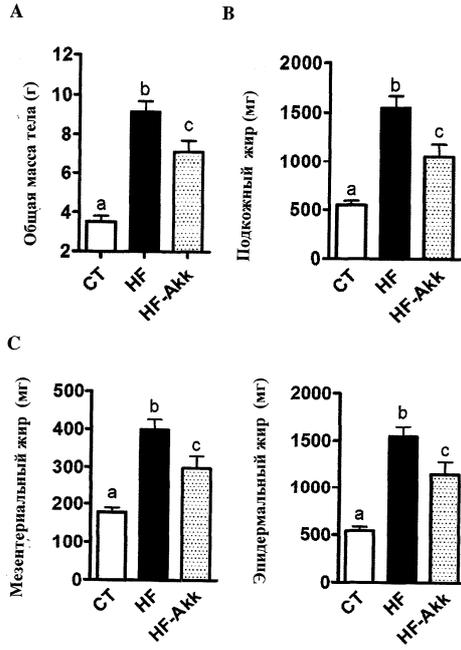
Фиг. 7



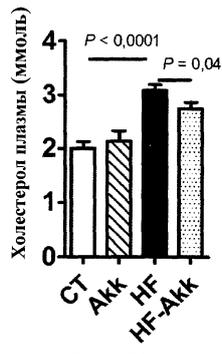
Фиг. 8



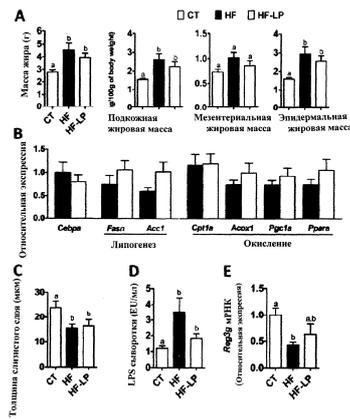
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12