

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041324**

(13) **B1**

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

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.11 | (51) Int. Cl. <i>A61K 35/74</i> (2015.01)
<i>A61K 35/741</i> (2015.01)
<i>A61K 9/00</i> (2006.01)
<i>A61P 3/00</i> (2006.01)
<i>A61P 1/00</i> (2006.01)
<i>A61P 9/00</i> (2006.01)
<i>A61P 19/00</i> (2006.01)
<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201800199 | |
| (22) Дата подачи заявки
2016.09.09 | |

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

- | | |
|---|-----------------------|
| (31) 15184758.9 | (56) WO-A1-2014076246 |
| (32) 2015.09.10 | US-A1-2013224155 |
| (33) EP | US-A1-2012183514 |
| (43) 2018.12.28 | |
| (86) PCT/EP2016/071327 | |
| (87) WO 2017/042347 2017.03.16 | |
| (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),
Пловье Хьюбер, Дрюар Селин (BE) | |
| (74) Представитель:
Баландина Л.А. (RU) | |

-
- (57) Описаны пастеризованные бактерии *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для лечения нарушения обмена веществ у нуждающегося в этом субъекта. Также описаны композиция, фармацевтическая композиция и лекарственное средство, содержащие пастеризованные бактерии *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты, для лечения нарушения обмена веществ. Кроме того описано применение пастеризованных бактерий *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов для стимулирования снижения веса у нуждающегося в этом субъекта.

B1

041324

041324

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к лечению нарушений обмена веществ, таких как, например, нарушения обмена веществ, связанные с избыточным весом и ожирением, такие как, например, сахарный диабет или высокий уровень холестерина. Более точно, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей пастеризованные бактерии *Akkermansia* spp. или их фрагменты, для лечения нарушения обмена веществ.

Предшествующий уровень техники

Ожирение является общемировой проблемой, при этом по оценкам число взрослых, страдающих ожирением, составляет около 600 миллионов человек. Эта эпидемия ожирения соотносится со значительным ростом распространенности связанных с ожирением нарушений, таких как, например, диабет, гипертония, сердечные патологии и заболевания печени. Из-за этих вызывающих потерю трудоспособности патологий в настоящее время ожирение рассматривается в западных странах как одна из важнейших проблем здравоохранения. Таким образом, существует действительная потребность в композициях и способах лечения или профилактики ожирения и/или связанных с ожирением нарушений.

Ожирение и связанные с ним заболевания сопровождаются (i) дисфункциями метаболизма (например, воздействием на гомеостаз глюкозы и липидный обмен); (ii) слабовыраженным воспалительным состоянием, связанным с повышением уровней липополисахаридов (ЛПС) в крови (также называемым метаболической эндотоксемией); и (iii) нарушением барьерной функции кишечника (т.е. повышенной проницаемостью кишечника), приводящим к транслокации компонентов бактерий и/или микроорганизмов в такие органы, как печень или жировая ткань. Таким образом, для лечения ожирения необходимо воздействие по меньшей мере на один, предпочтительно на два и более, предпочтительно на все три из этих трех факторов. Эти явления (т.е. воспаление кишечника, повышение уровня ЛПС и бактериальная транслокация) также наблюдаются во время воспалительных заболеваний кишечника, таких как, например, болезнь Крона, колит, язвенный колит, боль в кишечнике (например, колика) и другие воспалительные заболевания кишечника. Интересно, что как воспалительные заболевания кишечника, так и связанные с ожирением заболевания сопровождаются изменениями состава кишечной микробиоты.

Таким образом, одной из основных задач является усиление барьерной функции кишечника.

Кишечник человека колонизирован разнообразным, сложным и динамичным сообществом микробов более 1000 различных видов, которые непрерывно взаимодействуют с организмом-хозяином (Zoevendal и др., 2008. *Gut*. 57(11):1605-1615; Rajilic-Stojanovic и de Vos, 2014. *FEMS Microbiol. Rev.* 38:996-1047). Гомеостаз кишечной микробиоты зависит от характеристик организма-хозяина (возраста, пола, генетического фона и т.д.) и состояния окружающей среды (стресса, употребления лекарств, желудочно-кишечной хирургии, инфекционных и токсических веществ и т.д.), но также от повседневных изменений пищевого рациона.

Недавно признано, что кишечная микробиота имеет отношение к ряду нарушений головного мозга, таких как тревога, аутизм (Hsiao и др., 2013). *Cell*. 155(7):1451-1463), болезнь Паркинсона (Scheperjans и др., 2015. *Mov. Disord.* 30(3):350-8), болезнь Альцгеймера (Harach и др., 2015. arXiv:1509.02273) и рассеянный склероз (Berer и др., 2011. *Nature*. 479(7374):538-41).

Также доказано, что дисбаланс микроорганизмов в кишечнике является одним из факторов риска развития рака, такого как колоректальный рак (Zitvogel и др., 2015). *Sci. Transl. Med.* 7 (271):271psl; Louis и др., 2014. *Nat. Rev. Microbiol.* 12(10):661-72).

Также растет число доказательств роли кишечной микробиоты в развитии ожирения и связанных с ним нарушений (Delzenne & Cani, 2011. *Annu. Rev. Nutr.* 31:15-31) и воспаления кишечника (Włodarska и др., 2015. *Cell Host Microbe*. 17(5):577-91) или боли в кишечнике (например, колики младенцев) (de Weerth и др., 2013). *Pediatrics*. 131:E550). Во всех этих случаях (ожирение, воспаление кишечника, колики) дисбиоз микробиоты может также нарушать взаимовлияние органов и целостность кишечного барьера, что приводит к возникновению симптомов.

Соответственно, лечение средствами, которые нацелены на кишечную микробиоту, оказалось перспективным терапевтическим инструментом лечения ожирения и связанных с ним нарушений. Эти средства могут состоять из живых микробов, как в случае большинства пробиотиков, или могут содержать мертвые микробы или их фрагменты. Кроме того, эти средства могут содержать субстраты, которые используются кишечной микробиотой, как в случае пребиотиков, или могут содержать соединения, которые изменяют баланс кишечной микробиоты, такие как специфические противомикробные соединения.

Например, в WO 2008/076696 описана кишечная микробиота в качестве терапевтической мишени при лечении ожирения и связанных с ним нарушений. В WO 2008/076696 конкретно описаны способы изменения избытка *Bacteroidetes* и/или *Firmicutes* в кишечнике субъекта путем введения ему антибиотика и/или пробиотика.

Кроме того, в EP 2030623 описана профилактика и/или лечение нарушений обмена веществ, таких как, например, связанные с ожирением нарушения, путем регуляции количества *Enterobacteria* в кишечнике. В EP 2030623 описано уменьшение количества *Enterobacteria* в кишечнике путем введения пробиотических бактерий, таких как, например, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* или *Lactobacillus*.

В патентной заявке US 2012/083514 описаны зерновые продукты для детей, содержащие не воспроизводимые пробиотические микроорганизмы. В ней описана термическая обработка трех типов: 15 с при 140°C (сверхвысокой температуре); 15 с при 74, 90 и 120°C (в течение короткого времени при высокой температуре); и 20 мин при 85°C (в течение длительного времени при низкой температуре). Однако в этой патентной заявке показано, что в бактериях, подвергнутых термообработке при 85°C в течение 20 мин, значительно увеличивается отношение IL12/IL10. IL12 является провоспалительным цитокином, а IL10 является противовоспалительным цитокином. Таким образом, в заявке US 2012/083514 продемонстрировано, что термическая обработка при 85°C в течение 20 мин усиливает воспалительное состояние у субъекта, поэтому она не рекомендуется для лечения воспалительных заболеваний. Между тем, в US 2012/083514 продемонстрировано, что бактерии должны нагреваться в течение очень короткого времени (15 с) с целью обеспечения противовоспалительного профиля.

Кроме того, заявителем описано, что у получавших пребиотики мышей с ожирением модифицирована кишечная микробиота (Everard и др., 2011 Nov. *Diabetes*. 60 (LL):2775-86). Помимо этого, пребиотики (1) улучшают глюкозный и липидный обмен у мышей с ожирением и диабетом, (2) снижают уровень ЛПС в плазме и улучшают барьерную функцию кишечника (например, уменьшают воспаления) у мышей с ожирением, (3) индуцируют увеличение числа аргентаффинных L-клеток у мышей с ожирением и диабетом и (4) улучшают чувствительность к лептину и гомеостаз глюкозы у мышей с алиментарным ожирением и диабетом.

Заявителем также описано применение *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов для лечения ожирения и связанных с ним нарушений (WO 2014/076246). Кроме того, заявитель также обнаружил уменьшение количества *Akkermansia muciniphila* в кишечнике пациентов, страдающих язвенным колитом (Rajilic-Stojanovic M и др., 2013 Mar. *Inflamm. Bowel Dis*. 19(3):481-8). Обнаружено, что в случае болезни Крона происходит истощение в основном бактерий, продуцирующий бутират (Wlodarska и др., 2015). *Cell Host Microbe*. 17(5):577-91). Однако продемонстрировано, что *Akkermansia muciniphila*, которые продуцируют пропионат и ацетат короткоцепочечных жирных кислот могут вызывать образование трофических цепей, которые в качестве конечного продукта продуцируют бутират из слизи. Известно, что бутират уменьшает болевые ощущения в кишечнике и подобно ацетату и пропионату проявляют сигнализацию в иммунной системе. Наконец, продемонстрировано, что добавление *Akkermansia muciniphila* усиливает барьерную функцию в линии клеток человека (Reunanen и др., 2015). *Appl. Environ. Microbiol*. 81 (LL):3655-62). Следовательно, весьма вероятно, что *Akkermansia muciniphila* и их продукты могут уменьшать боль и воспаление кишечника, а также усиливать кишечный барьер у здоровых людей и у пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями кишечника. Это может относиться не только к взрослым, но и к младенцам, так как уменьшение количества продуцентов бутирата связывали с чрезмерным плачем при детских коликах и atopических заболеваниях у младенцев (de Weerth и др., 2013). *Gut Microbes*. 4(5):416-21; Nylund и др., 2015. *Allergy*. 70(2):241-4).

Однако заявителем неожиданно продемонстрировано, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* более эффективно для усиления барьерной функции и лечения метаболических дисфункций, связанных с ожирением и сопутствующими нарушениями, чем не пастеризованных *Akkermansia muciniphila*. Таким образом, в настоящем изобретении предложено применение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов с целью усиления барьерной функции и лечения ожирения и связанных с ним нарушений.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложены *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для применения при лечении нарушения обмена веществ у нуждающегося в этом субъекта, при этом *Akkermansia muciniphila* пастеризованы.

В одном из конкретных вариантов осуществления применяют *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для лечения ожирения.

В одном из вариантов осуществления применяют *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для лечения нарушения обмена веществ, которое выбрано из группы, включающей метаболический синдром; нарушения, связанные с дефицитом инсулина или инсулинорезистентностью; сахарный диабет, включая диабет 2 типа; непереносимость глюкозы; аномальный липидный обмен; атеросклероз; гипертензию; преэклампсию; сердечную патологию; инсульт; безалкогольную жировую болезнь печени; гипергликемию; печеночный стеатоз; заболевания печени, включая фиброз, связанный с ожирением и аномальными функциями печени, в частности, с изменениями продукции желчи и иммунитета; дислипидемию; дисфункцию иммунной системы, связанную с избыточным весом и ожирением; воспалительные, иммунные заболевания и нарушения барьерной функции, включая воспалительное заболевание кишечника, более точно, болезнь Крона и язвенный колит, а также синдром раздраженной толстой кишки; сердечно-сосудистые заболевания; высокий уровень холестерина; повышенный уровень триглицеридов; астму; апноэ во сне; остеоартрит; нейродегенерацию; болезнь желчного пузыря; синдром X; атерогенную дислипидемию и рак.

В настоящем изобретении также предложены *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для увеличения потребления энергии субъектом предпочтительно без влияния на потребление пищи субъектом, при этом *Akkermansia muciniphila* пастеризованы.

Другой задачей изобретения является применение *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов для усиления ощущения сытости у субъекта, при этом *Akkermansia muciniphila* пастеризованы.

В одном из вариантов осуществления *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты с целью описанного выше применения вводят перорально.

В одном из вариантов осуществления вводят субъекту *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты с целью описанного выше применения в количестве от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ клеток, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{11}$, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток.

В одном из вариантов осуществления изобретения вводят *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты с целью описанного выше применения по меньшей мере три раза в неделю.

В одном из вариантов осуществления вводят *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты с целью описанного выше применения совместно с другим пробиотическим штаммом и/или другими бактериями и/или микроорганизмами с благоприятными эффектами и/или с одним или несколькими пребиотиками.

В настоящем изобретении также предложена композиция для применения с целью лечения нарушения обмена веществ или увеличения потребления энергии субъектом или усиления ощущения сытости у субъекта, содержащей *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты и эксципиент.

В одном из вариантов осуществления упомянутой композицией является пищевая композиция.

В одном из вариантов осуществления вводят упомянутую композицию перорально.

Другой задачей изобретения является создание фармацевтической композиции для лечения нарушения обмена веществ или увеличения потребления энергии субъектом или усиления ощущения сытости у субъекта, содержащей *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложено лекарственное средство для лечения нарушения обмена веществ или увеличения потребления энергии субъектом или усиления ощущения сытости у субъекта, содержащее *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты.

В настоящем изобретении также предложено применение *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов для стимулирования потери веса у нуждающегося в этом субъекта, при этом *Akkermansia muciniphila* пастеризованы.

Другой задачей изобретения является создание косметической композиции, содержащей *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для стимулирования потери веса у нуждающегося в этом субъекта, при этом *Akkermansia muciniphila* пастеризованы.

Определения.

В настоящем изобретении следующие термины имеют следующие значения.

Термин "лечение" означает предотвращение (т.е. недопущение), ослабление или облегчение по меньшей мере одного побочного эффекта или симптома заболевания, нарушения или состояния. Таким образом, этот термин относится как к лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам; при этом задачей является предотвращение или замедление развития (ослабление) целевого патологического состояния или нарушения. В одном из вариантов осуществления изобретения нуждающиеся в лечении лица включают тех, кто уже страдают нарушением, а также тех, кто предрасположены к нарушению, или тех, у кого должно быть предотвращено нарушение.

Термин "эффективное количество" относится к содержанию или количеству средства, которое имеет целью, не вызывая значительных отрицательных или неблагоприятных побочных эффектов для мишени, (1) задерживать или предотвращать возникновение нарушения обмена веществ; (2) замедлять или останавливать прогрессирование, обострение или ухудшение одного или нескольких симптомов нарушения обмена веществ; (3) обеспечивать улучшения симптомов нарушения обмена веществ; (4) снижать тяжесть или частоту возникновения нарушения обмена веществ; (5) излечивать нарушение обмена веществ; или (6) восстанавливать нормальное количество и/или содержание *Akkermansia muciniphila* в кишечнике подлежащего лечению субъекта. Эффективное количество может вводиться до возникновения нарушения обмена веществ в качестве профилактической или предупредительной меры. В качестве альтернативы или дополнительно, эффективное количество может вводиться после возникновения нарушения обмена веществ с целью оказания терапевтического действия.

Термин "*Akkermansia muciniphila*" относится к разлагающим муцин бактериям обнаруженным Дерриеном (Derrien и др., 2004). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1469-1476). Их клетки имеют овальную форму, неподвижны и являются грамтрицательными. *Akkermansia muciniphila* также могут именоваться *Akkermansia* spp. или *Akkermansia*-подобными бактериями. Они относятся к группе *Chlamydiae/ Verrucomicrobia*; типу *Verrucomicrobia*. В случае изменения таксономии специалисту было бы известно, как адаптировать изменения в таксономии, чтобы вывести штаммы, которые могли бы использоваться в настоящем изобретении. Более того, заявителем определен полный геном *Akkermansia muciniphila* (van Pasael и др., 2011. *PLoS One.* 6 (3):e16876). Общеизвестно, что штаммы со сходством нуклеотидов, которое, как экспериментально установлено путем гибридизации ДНК, составляет около 70%, могут считаться одним и тем же видом, что соответствует средней идентичности нуклеотидов (ANI) около 95% (Goris и др., 2007. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:81-91).

Термин "пастеризованные *Akkermansia muciniphila*" относится к *Akkermansia muciniphila*, подвергнутым тепловой обработке. В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* означают *Akkermansia muciniphila*, которые нагревали до температуры 50-100°C в течение по меньшей мере 10 мин.

Термин "пробиотики" относится к препаратам микробных клеток (таких как, например, живые микробные клетки), которые при их введении в эффективном количестве оказывают благотворное влияние на здоровье или состояние субъекта. По определению все пробиотики обладают доказанным непатогенным характером. В одном из вариантов осуществления эти преимущества для здоровья связаны с улучшением баланса микробиоты человека или животного в желудочно-кишечном тракте и/или восстановлением нормальной микробиоты.

Термин "пребиотик" относится к веществу, такому как, например, вещество, которое не может быть переварено человеком, но которое модулирует состав и/или активность кишечной микробиоты посредством его преобразования в ходе обмена веществ микроорганизмами в кишечнике, осуществляя тем самым полезное физиологическое воздействие на организм-хозяин.

Термин "субъект" относится к животному, предпочтительно к млекопитающему, более предпочтительно к человеку. В одном из вариантов осуществления субъектом является субъект мужского пола. В другом варианте осуществления субъектом является субъект женского пола. В одном из вариантов осуществления изобретения субъектом также может являться домашнее животное, например собака, кошка, морская свинка, хомяк, крыса, мышь, хорек, кролик и т.п.

Термин "избыточный вес" относится к ситуации, когда упомянутый субъект имеет индекс массы тела (ИМТ) в диапазоне от 25 до 30. Используемый термин ИМТ определяется как масса тела человека (в кг), деленная на квадрат его роста (в метрах).

Термин "ожирение" относится к ситуации, когда ИМТ упомянутого субъекта составляет 30 или более.

Термин "около", предшествующий какой-либо численной величине, означает плюс или минус 20%, предпочтительно плюс или минус 10% от упомянутой величины.

Термин "фрагмент" может относиться к клеточным компонентам, метаболитам, секретируемым молекулам и соединениям, образующимся в результате метаболизма пастеризованных *Akkermansia muciniphila* и т.п. Фрагменты могут быть получены, например, путем восстановления супернатанта культуры *Akkermansia muciniphila* после пастеризации или путем экстрагирования компонентов или фракций клеток, метаболитов или секретируемых соединений из культуры *Akkermansia muciniphila* после пастеризации. Термин "фрагмент" также может относиться к продукту распада. Фрагмент может означать компонент в выделенной форме или любую смесь одного или нескольких компонентов, полученных из пастеризованных *Akkermansia muciniphila*. В одном из вариантов осуществления фрагмент может означать один или несколько таких компонентов, присутствующих в пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, которые продуцируются другим способом, таким как технология получения рекомбинантных ДНК, в организме-носителе микробов или в ходе любого другого (био)синтетического процесса.

Термин "нарушение обмена веществ" относится к нарушениям и состояниям, которые вызваны или характеризуются аномальным увеличением веса, расходом или потреблением энергии, измененными ответами на принимаемые внутрь или эндогенные питательные вещества, источники энергии, гормоны или другие сигнальные молекулы в организме или измененным углеводным, липидным, белковым, нуклеиновым обменом или их сочетанием. Нарушение обмена веществ может быть связано с дефицитом или избытком метаболического пути, что приводит к дисбалансу углеводного, липидного, белкового и/или нуклеинового обмена. Примеры нарушений обмена веществ включают без ограничения метаболический синдром, нарушения, связанные с дефицитом инсулина или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (такой как, например, диабет 2 типа), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертензию, преэклампсию, сердечную патологию, инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени различной этиологии, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с избыточным весом и ожирением, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, астму, апноэ во сне, остеоартрит, нейродегенерацию, болезнь желчного пузыря, синдром X, воспалительные и иммунные нарушения, атерогенную дислипидемию и рак.

Подробное описание изобретения

Заявителем продемонстрировано, что при введении пастеризованных *Akkermansia muciniphila* наблюдаются более важные благоприятные воздействия на метаболизм, чем при введении не пастеризованных *Akkermansia muciniphila* (примеры).

Следовательно, в настоящем изобретении предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для лечения или применения при лечении нарушений обмена веществ у нуждающегося в этом субъекта.

Используемый термин "нарушение обмена веществ" означает нарушение, связанное с измененным метаболическим гомеостазом, таким как, например, измененный глюкозный или липидный гомеостаз.

В одном из вариантов осуществления изобретения нарушением обмена веществ является ожирение.

Примеры других нарушений обмена веществ включают без ограничения метаболический синдром, нарушения, связанные с дефицитом инсулина или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (такой как, например, диабет 2 типа), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертензию, преэклампсию, сердечную патологию, инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с избыточным весом и ожирением, заболевания печени (такие как, например, фиброз, связанный с ожирением, или аномальные функции печени, включая изменения в продукции желчи, иммунитете и т.п.), воспалительные, иммунные заболевания и нарушения барьерной функции (такие как, например, воспалительное заболевание кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, и синдром раздраженной толстой кишки), сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, астму, апноэ во сне, остеоартрит, нейродегенерацию, болезнь желчного пузыря, синдром Х, воспалительные и иммунные нарушения, атерогенную дислипидемию и рак.

В другом варианте осуществления нарушением обмена веществ является нарушение обмена веществ, связанное с избыточным весом и/или ожирением, т.е. нарушение обмена веществ, которое может сопровождаться или может быть вызвано избыточным весом и/или ожирением. Примеры нарушений обмена веществ, связанных с избыточным весом и/или ожирением, включают без ограничения метаболический синдром, нарушения, связанные с дефицитом инсулина или инсулинорезистентностью, сахарный диабет (такой как, например, диабет 2 типа), непереносимость глюкозы, аномальный липидный обмен, атеросклероз, гипертензию, сердечную патологию, инсульт, безалкогольную жировую болезнь печени, гипергликемию, стеатоз печени, дислипидемию, дисфункцию иммунной системы, связанную с избыточным весом и ожирением, сердечно-сосудистые заболевания, высокий уровень холестерина, повышенный уровень триглицеридов, астму, апноэ во сне, остеоартрит, нейродегенерацию, болезнь желчного пузыря, синдром Х, воспалительные и иммунные нарушения, атерогенную дислипидемию и рак.

В одном из вариантов осуществления нарушением обмена веществ является сахарный диабет, предпочтительно диабет 2 типа. В другом варианте осуществления нарушением обмена веществ является гиперхолестеринемия (также известная как высокий уровень холестерина). В одном из вариантов осуществления гиперхолестеринемия соответствует содержанию холестерина в плазме, равной 2 г/л или 5 ммоль/л или выше. В другом варианте осуществления гиперхолестеринемия соответствует соотношению между содержанием общего холестерина в плазме крови и содержанием ЛПВП (липопротеинов высокой плотности) в плазме крови 4,5:1, предпочтительно 5:1 или выше.

Используемый термин "пастеризованные *Akkermansia muciniphila*" означает *Akkermansia muciniphila*, подвергнутые нагреву. В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению нагревают до температуры 50-100°C, предпочтительно 60-95°C, более предпочтительно 70-90°C. В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению нагревают до температуры 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 или 59°C. В другом варианте осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению нагревают до температуры 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 или 69°C. В еще одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению нагревают до температуры 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 или 79°C. В еще одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению нагревают до температуры 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89°C. В еще одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению нагревают до температуры 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99°C или 100°C.

В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению не нагревают до температуры выше 100°C. В конкретных вариантах осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению не нагревают до сверхвысокой температуры, например 110-140°C. В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению не нагревают до температуры выше 90°C. Соответственно, в одном из вариантов осуществления изобретения *Akkermansia muciniphila* не стерилизуют. Стерилизацией является обработка с целью разрушения, уничтожения или инактивации всех форм жизни и других биологических агентов. В их число входят микроорганизмы и их споры, а также вирусы и прионы. В отличие от стерилизации, пастеризация не имеет целью уничтожение всех микроорганизмов, а обычно применяется к пищевым продуктам с целью уменьшения количества жизнеспособных патогенов.

В одном из вариантов осуществления изобретения нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* в течение по меньшей мере 10 мин. В другом варианте осуществления изобретения нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* в течение по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35 или 45 мин. В одном из вариантов осуществления нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению в течение 10-45 мин.

В одном из вариантов осуществления не нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* в течение короткого времени. В конкретных вариантах осуществления не нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* в течение от 1 до 30 с, от 1 до 60 с, от 1 до 90 с или от 1 до 120 с. В одном из предпочтительных вариантов осуществления не нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* в течение менее 1 мин, предпочтительно в течение менее 5, 6, 7, 8 или 9 мин.

В одном из вариантов осуществления нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* до температуры 50-100°C в течение по меньшей мере 10 мин. В одном из конкретных вариантов осуществления нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению до 60°C в течение 20 или 30 мин. В другом конкретном варианте осуществления нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению до 70°C в течение 20 или 30 мин. В другом конкретном варианте осуществления нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению до 80°C в течение 20 или 30 мин. В другом конкретном варианте осуществления нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению до 90°C в течение 20 или 30 мин.

В одном из конкретных вариантов осуществления не нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* до температуры выше 110°C в течение около 1-120 с. В другом конкретном варианте осуществления не нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* до температуры выше 100°C в течение около 1-120 с. В другом конкретном варианте осуществления не нагревают пастеризованные *Akkermansia muciniphila* до температуры выше 90°C в течение около 1-120 с.

В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению представляет собой нежизнеспособные клетки. Используемый термин "нежизнеспособные клетки" означает клетки, которые не способны размножаться. Жизнеспособность и пролиферация клеток могут определяться любым способом, известным специалисту в данной области техники. Например, жизнеспособность и пролиферация клеток могут оцениваться путем распределения раствора, содержащего пастеризованные *Akkermansia muciniphila*, по чашке Петри или любыми другими способами культивирования и путем подсчета количества клонов или определения оптической плотности по истечении определенного времени инкубации в оптимальных условиях роста.

Кроме того, количество клеток, включая жизнеспособные, а также нежизнеспособные клетки, т.е., по меньшей мере, не нарушена ли целостность клеток, также может определяться путем наблюдения под микроскопом. Хотя хорошо известным способом для этого является фазово-контрастная микроскопия, клетки микробов могут дополнительно визуализироваться путем специфического окрашивания красителями, флуоресцентными зондами или антителами. Это позволяет облегчать наблюдения под микроскопом, при этом количество окрашенных клеток также может подсчитываться путем проточной цитометрии. Примеры визуализации или подсчета клеток *Akkermansia muciniphila* приведены у Derrien и др. (2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1646-8), Derrien и др. (2011. *Frontiers Microbiol.* 2:166-175) или Reunanen и др. (2015. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(LL):3655-62).

В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты является преимущественно очищенными. Используемый термин "преимущественно очищенные" означает, что пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты содержатся в образце, в котором на их долю приходится по меньшей мере около 50%, предпочтительно по меньшей мере около 60, 70, 80, 85, 90, 95, 99% или более бактериальных штаммов или их фрагментов, содержащихся в упомянутом образце.

В настоящем изобретении также предложена композиция, содержащая эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов, для лечения или для применения при лечении нарушения обмена веществ.

В одном из вариантов осуществления изобретения эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству бактерий, достаточному для восстановления нормального количества и/или доли *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта. В одном из вариантов осуществления изобретения нормальное количество и/или доля *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству и/или доле *Akkermansia muciniphila*, присутствующих в кишечнике здорового субъекта.

Используемый термин "здоровый субъект" используется для определения субъекта, который не страдает заболеванием, подлежащим лечению. Например, если пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты применяют для лечения ожирения, здоровый субъект не страдает ожирением. Здоровый субъект предпочтительно обладает такими же характеристиками, как и подлежащий лечению субъект, такими как, например, один и тот же пол, возраст, пол, пищевой рацион, употребление лекарств или географическое местоположение.

В одном из вариантов осуществления изобретения нормальная доля *Akkermansia muciniphila* в кишечнике составляет от около 0,1 до около 10% (в перечете на количество клеток *Akkermansia muciniphila* от общего количества бактериальных клеток в кишечнике), предпочтительно от около 0,3 до около 5%, более предпочтительно от около 1 до около 3%.

В одном из вариантов осуществления эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* согласно изобретению соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ КОЕ и еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ КОЕ, при этом КОЕ означает "колониобразующую единицу".

В другом варианте осуществления изобретения эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ.

почтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ клеток/г композиции, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ клеток/г композиции.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит пастеризованные *Akkermansia muciniphila*, количество которых составляет от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ клеток/мл композиции, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ клеток/мл композиции, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ клеток/мл композиции.

В другом варианте осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит пастеризованные *Akkermansia muciniphila*, количество которых составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток/г или клеток/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/г или клеток/мл, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток/г или клеток/мл.

В другом варианте осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит пастеризованные *Akkermansia muciniphila*, количество которых составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток/г или клеток/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток/г или клеток/мл, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток/г или клеток/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит фрагменты пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, количество которых соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ/г или КОЕ/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ КОЕ/г или КОЕ/мл композиции, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/г или КОЕ/мл композиции, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ КОЕ/г или КОЕ/мл композиции.

В другом варианте осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит фрагменты пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, количество которых соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/г или КОЕ/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/г или КОЕ/мл, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/г или КОЕ/мл.

В другом варианте осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит фрагменты пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, количество которых соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/г или КОЕ/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/г или КОЕ/мл, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/г или КОЕ/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит фрагменты пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, количество которых составляет от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток/г или клеток/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ клеток/г или клеток/мл композиции, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ клеток/г или клеток/мл композиции и еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ клеток/г или клеток/мл композиции.

В другом варианте осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит фрагменты пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, количество которых составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток/г или клеток/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/г или клеток/мл, более предпочтительно от около $1,10^9$ до $1,10^{10}$ клеток/г или клеток/мл.

В другом варианте осуществления изобретения композиция согласно изобретению содержит фрагменты пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, количество которых составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток/г или клеток/мл композиции, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток/г или клеток/мл, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток/г или клеток/мл.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция согласно изобретению предназначена для лечения или предотвращения нарушения обмена веществ. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция предназначена для восстановления нормальной доли *Akkermansia muciniphila* или увеличения количества любых активных соединений *Akkermansia muciniphila* в кишечнике нуждающегося в этом субъекта.

Используемый термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" относится к эксципиенту, который не вызывает неблагоприятной, аллергической или другой нежелательной реакции при введении животному, предпочтительно человеку. Он может включать любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические средства и средства, задерживающие поглощение, и т.п. При введении человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, апиrogenности, общей безопасности и чистоты согласно требованиям стандартов отдела биологии FDA.

В настоящем изобретении также предложено лекарственное средство, содержащее эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство согласно изобретению предназначено для лечения или предотвращения нарушения обмена веществ. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное

средство предназначено для восстановления нормальной доли *Akkermansia muciniphila* в кишечнике нуждающегося в этом субъекта.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения или предотвращения нарушения обмена веществ у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов.

Другой задачей изобретения является создание способа восстановления нормальной доли *Akkermansia muciniphila*, их фрагментов или других активных соединений *Akkermansia muciniphila* в кишечнике нуждающегося в этом субъекта, включающего введение субъекту эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов.

В одном из вариантов осуществления способ согласно изобретению включает введение субъекту эффективного количества композиции, фармацевтической композиции или лекарственного средства согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию, фармацевтическую композицию или лекарственное средство по меньшей мере один раз в неделю, предпочтительно по меньшей мере два раза в неделю, более предпочтительно по меньшей мере три раза в неделю, еще более предпочтительно по меньшей мере четыре раза в неделю. В другом варианте осуществления вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию, фармацевтическую композицию или лекарственное средство по меньшей мере один раз в день, предпочтительно по меньшей мере два раза в день.

В одном из вариантов осуществления вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию, фармацевтическую композицию или лекарственное средство согласно изобретению в течение 1 недели, предпочтительно в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель или более.

В одном из вариантов осуществления вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию, фармацевтическую композицию или лекарственное средство согласно изобретению в течение периода, который длится до достижения желаемого результата (например, снижения веса, излечения нарушения обмена веществ, снижения уровня холестерина в плазме и т.д.).

В одном из вариантов осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов или композиции, фармацевтической композиции или лекарственного средства согласно изобретению является постоянным, т.е. не ограничено во времени.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, предпочтительно от

около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения субъект имеет избыточный вес. В другом варианте осуществления субъект страдает ожирением.

В одном из вариантов осуществления изобретения у субъекта диагностировано нарушение обмена веществ, такое как, например, нарушение обмена веществ, связанное с избыточным весом и/или ожирением.

В одном из вариантов осуществления изобретения у субъекта диагностировано нарушение обмена веществ, такое как, например, нормальный вес и/или нарушенное содержание глюкозы натощак и/или гипертриглицеридемия и/или любое сопутствующее нарушение обмена веществ или сердечнососудистый фактор риска.

В другом варианте осуществления субъект подвержен риску развития нарушения обмена веществ, такого как, например, нарушение обмена веществ, связанное с избыточным весом и/или ожирением. В одном из вариантов осуществления указанный риск связан с тем, что субъект имеет избыточный вес или страдает ожирением. В другом варианте осуществления указанный риск соответствует предрасположенности, такой как, например, семейная предрасположенность к нарушению обмена веществ, такому как, например, нарушение обмена веществ, связанное с избыточным весом и/или ожирением.

В одном из вариантов осуществления изобретения субъект страдает нарушением состава кишечной микробиоты. Кишечная микробиота указанного субъекта предпочтительно имеет недостаточное количество штаммов *Akkermansia muciniphila*. В одном из вариантов осуществления доля *Akkermansia muciniphila* в кишечнике субъекта составляет менее 1%, предпочтительно менее 0,5%, более предпочтительно менее 0,1% в пересчете на количество клеток *Akkermansia muciniphila* от общего количества бактериальных клеток в кишечнике.

В настоящем изобретении также предложено косметическое применение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов с целью содействия снижению веса у субъекта.

Таким образом, другой задачей изобретения является создание косметической композиции, содержащей косметически эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов, и ее применение с целью содействия снижению веса у субъекта. Используемый термин "косметически эффективное количество" относится к количеству косметической композиции, необходимому и достаточному для содействия косметическому эффекту, такому как, например, стимулирование снижения веса у субъекта.

В настоящем изобретении также предложен способ содействия снижению веса у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов.

В одном из вариантов осуществления способ согласно изобретению включает введение субъекту косметически эффективного количества композиции или косметической композиции согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения косметически эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ КОЕ.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество пастеризо-

ванных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ КОЕ.

В одном из вариантов осуществления изобретения косметически эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* составляет от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ клеток, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ клеток.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila* составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток.

В одном из вариантов осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ КОЕ.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila* соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ КОЕ, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ КОЕ, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ КОЕ.

В одном из вариантов осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila* составляет от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток, предпочтительно от около $1,10^4$ до около $1,10^{12}$ клеток, более предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{10}$ клеток, еще более предпочтительно от около $1,10^6$ до около $1,10^9$ клеток.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila* составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток.

В другом варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila* составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток.

В одном из вариантов осуществления изобретения вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию или косметическую композицию по меньшей мере один раз в неделю, предпочтительно по меньшей мере два раза в неделю, более предпочтительно по меньшей мере три раза в неделю, еще более предпочтительно при по меньшей мере четыре раза в неделю. В другом варианте осуществления вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию или косметическую композицию по меньшей мере один раз в день, предпочтительно по меньшей мере два раза в день.

В одном из вариантов осуществления вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию или косметическую композицию в течение 1 недели, предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель или более.

В одном из вариантов осуществления вводят пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композицию или косметическую композицию согласно изобретению в течение периода, который длится до достижения желаемого результата (например, снижения веса и т.д.).

В одном из вариантов осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов или композиции или косметической композиции согласно изобретению является постоянным, то есть не ограничено во времени.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{12}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, еще более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день.

$1,10^{10}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации в пределах от $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{12}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, еще более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{12}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, еще более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ КОЕ/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, соответствует количеству фрагментов *Akkermansia muciniphila* до стадии пастеризации, составляющему от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ КОЕ/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от около $1,10^2$ до около $1,10^{15}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^5$ до около $1,10^{12}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, еще более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{10}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^9$ до около $1,10^{10}$ клеток/день.

В другом варианте осуществления изобретения ежедневное количество фрагментов пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, вводимых за день, составляет от около $1,10^6$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, предпочтительно от около $1,10^8$ до около $1,10^{11}$ клеток/день, более предпочтительно от около $1,10^{10}$ до около $1,10^{11}$ клеток/день.

В одном из вариантов осуществления субъектом не является субъект, страдающий ожирением. В другом варианте осуществления субъект имеет избыточный вес.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство дополнительно содержат дополнительные пробиотические штаммы или виды, такие как, например, бактериальные пробиотические штаммы или виды; прокариотические пробиотики помимо бактерий; или грибковые штаммы или виды, предпочтительно дрожжевые штаммы или виды. В одном из вариантов осуществления указанные дополнительные пробиотические штаммы или виды выбраны из тех, которые от природы присутствуют в кишечнике субъекта, предпочтительно в кишечнике человека, более предпочтительно в кишечнике здоровых людей.

Примеры бактериальных пробиотических штаммов или видов, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включают без ограничения *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Desemzia*, *Christensenella*, *Allobaculum*, *Coprococcus*, *Collinsella*, *Citrobacter*, *Turicibacter*, *Sutterella*, *Subdoligranulum*, *Streptococcus*, *Sporobacter*, *Sporacetigenium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Proteus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Papillibacter*, *Oscillospira*, *Melissococcus*, *Dorea*, *Dialister*, *Clostridium*, *Cedecea*, *Catenibacterium*, *Butyrivibrio*, *Buttiauxella*, *Bulleidia*, *Bilophila*, *Bacteroides*, *Anaerovorax*, *Anaerostipes*, *Anaerofilum*, *Enterobacteriaceae*, *Fermitutes*, *Atopobium*, *Alistipes*, *Acinetobacter*, *Slackie*, *Shigella*, *Shewanella*, *Serratia*, *Mahella*, *Lachnospira*, *Klebsiella*, *Idiomarina*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Eggerthella*.

В одном из конкретных вариантов осуществления указанные бактериальные пробиотические

штаммы или виды выбраны из группы, включающей *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. В одном из вариантов осуществления пробиотические штаммы или виды *Bifidobacterium* предпочтительно выбраны из группы, включающей *Bifidobacterium animalis*, более предпочтительно *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* и *Bifidobacterium lactis*. В одном из вариантов осуществления пробиотические штаммы *Lactobacillus* или виды предпочтительно выбраны из группы, включающей *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus acidophilus*.

Примеры прокариотических штаммов или видов, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включают без ограничения Archaea, Firmicutes, Verrucomicrobia, Christensenella, Bacteroidetes (такие как, например, *Allistipes*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides splachnicus*, *Bacteroides stercoris*, *Parabacteroides*, *Prevotella ruminicola*, *Porphyromonadaceae* и родственные рода), Proteobacteria, Betaproteobacteria (такие как, например, *Aquabacterium* и *Burkholderia*), Gammaproteobacteria (такие как, например, *Xanthomonadaceae*), Actinobacteria (такие как, например, *Actinomycetaceae* и *Atopobium*), Fusobacteria, Methanobacteria, Spirochaetes, Fibrobacteres, Deferribacteres, Deinococcus, Thermus, Cyanobacteria, Methanobrevibacteria, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Coprococcus, Subdoligranulum, Dorea, Bulleidia, Anaerofustis, Gemella, Roseburia, Dialister, Anaerotruncus, Staphylococcus, Micrococcus, Propionobacteria, Enterobacteriaceae, Faecalibacterium, Bacteroides, Parabacteroides, Prevotella, Eubacterium, Bacilli (такие как, например, *Lactobacillus salivarius* и родственные виды, *Aerococcus*, *Granulicatella*, *Streptococcus bovis* и родственные рода и *Streptococcus intermedius* и родственные рода), Clostridium (например, *Eubacterium hallii*, *Eubacterium limosum* и родственные рода) и *Butyrivibrio*.

Примеры грибковых пробиотических штаммов или видов, предпочтительно дрожжевых пробиотических штаммов или видов, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включают, без ограничения аскомицеты, зигомицеты и дейтеромицеты, предпочтительно из групп *Aspergillus*, *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Clavispora*, *Bretanomyces*, *Pichia*, *Amylomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Endomyces*, *Hyphopichia*, *Zygosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Yarrowia*, *Endomyces*, *Debaryomyces* и/или *Penicillium*.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство не содержит бактериальные штаммы *Lactobacillus-Enterococcus*, *Bacteroides* и/или *Atopobium*.

В одном из вариантов осуществления изобретения единственным микробным штаммом или видом, предпочтительно бактериальным штаммом или видам, входящим в состав фармацевтической композиции, косметической композиции или лекарственного средства, является *Akkermansia muciniphila*.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство состоит из пастеризованных *Akkermansia muciniphila*.

В другом варианте осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство состоит преимущественно из пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, при этом "состоит преимущественно" в данном случае означает, что *Akkermansia muciniphila* является единственным микробным штаммом или видом, предпочтительно единственным бактериальным штаммом или видом в композиции, фармацевтической композиции, косметической композиции или лекарственном средстве.

В одном из вариантов осуществления изобретения пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты активирует или ингибирует рост и/или биологическую активность другого бактериального штамма(-ов) или видов кишечной микробиоты.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство дополнительно содержат пребиотик.

Примеры пребиотиков, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включают без ограничения инулина и фруктаны инулинового типа, олигофруктозу, бета-глюканы, ксилозу, арабинозу, арабиноксилан, рибозу, галактозу, рамнозу, целлобиозу, фруктозу, лактозу, салицин, сахарозу, глюкозу, эскулин, твин 80, трегалозу, мальтозу, маннозу, мелибиозу, слизь или муцины, раффинозу, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, аминокислоты, спирты, ферментируемые углеводы и любые их сочетания.

Другие неограничивающие примеры пребиотиков включают водорастворимые производные целлюлозы, нерастворимые в воде производные целлюлозы, непросеянную овсяную муку, метамуцил, пшеничные хлопья из непросеянной муки с сахаром и солодом и любые их сочетания.

Примеры водорастворимых производных целлюлозы включают без ограничения метилцеллюлозу, метилэтилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, этилгидроксиэтилцеллюлозу, катионную гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу.

Пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство согласно изобретению могут вводиться несколькими путями. Примеры применимых путей введения включают без ограничения пероральное введение, ректальное введение, введение посредством эзофагогастродуоденоскопии, введение

посредством колоноскопии, введение с использованием назогастральной или орогастральной трубки и т.п.

В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты или композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство согласно изобретению находятся в форме, пригодной для перорального введения. Согласно первому варианту осуществления формой, приспособленной для перорального введения, является твердая форма, выбранная из группы, включающей таблетки, пилюли, капсулы, мягкие желатиновые капсулы, таблетки с покрытием из сахара, таблетки для рассасывания в полости рта, шипучие таблетки или другие твердые формы. Согласно второму варианту осуществления формой, приспособленной для перорального введения, является жидкая форма, такая как, например, питьевой раствор, липосомальные формы и т.п.

В одном из вариантов осуществления композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство согласно изобретению дополнительно содержат эксципиенты, разбавители и/или носители, выбранные с учетом предполагаемого пути введения. Примеры эксципиентов, разбавителей и/или носителей включают без ограничения физиологический раствор, буферный фосфатом физиологический раствор, бикарбонат натрия, сок, молоко, йогурт, детскую смесь, молочный продукт, красители, такие как, например, диоксид титана (E1 71), двуокись железа (E1 72) и бриллиантовый черный BN (E1 51); ароматизаторы; загустители, такие как, например, моностеарат глицерина; подсластители; пленкообразователи, такие как, например, рафинированное рапсовое масло, соевое масло, арахисовое масло, соевый лецитин или рыбный желатин; разбавители, такие как, например, лактоза, моногидрат лактозы или крахмал; связующие вещества, такие как, например, повидон, пептизированные крахмалы, камеди, сахароза, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 4000 или ПЭГ 6000; разрыхлители, такие как, например, микрокристаллическая целлюлоза или карбоксиметилкрахмал натрия, такой как, например, карбоксиметилкрахмал натрия типа А; смазывающие вещества, такие как, например, стеарат магния; улучшители текучести, такие как, например, коллоидный безводный диоксид кремния и т.д.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство находятся в форме питательной композиции, т.е. содержат жидкий или твердый пищевой продукт, корм или питьевую воду. В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство представляет собой пищевой продукт, такой как, например, молочные продукты, молочные напитки, йогурт, фруктовый или овощной сок или его концентрат, порошковые напитки на основе солода или сои или злаков, сухие завтраки, такие как мюсли, хлопья, порошковые фруктовые и овощные соки, зерновые и/или шоколадные батончики, кондитерские изделия, пасты, мука, молоко, смузи, кондитерские изделия, молочные продукты, сухое молоко, восстановленное молоко, кисломолочные продукты, йогурт, питьевой йогурт, термостатный йогурт, напитки, молочные напитки, шоколад, гели, мороженое, крупы, восстановленные фруктовые продукты, закусочные, батончики, энергетические батончики, батончики из мюсли, пасты, соусы, молочные продукты, включая йогурты и сыры, напитки, включая напитки на молочной и немолочной основе, питательные добавки для спортсменов, включая питательные добавки на молочной и немолочной основе.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция или лекарственное средство находится в форме пищевой добавки, питьевой добавки, диетической добавки, питательного продукта, пищевого продукта для специальных медицинских целей или нутрицевтической композиции.

Известно, что ожирение и связанные с ним нарушения сопровождаются повышенной проницаемостью кишечника и нарушением продукции слизи, эпителиального барьера, иммунной системы и/или продукции антибактериальных соединений в организме субъекта; при этом заявитель предполагает, что эти параметры могут восстанавливаться при введении пастеризованных *Akkermansia muciniphila*.

Соответственно, в настоящем изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для снижения проницаемости кишечника и/или для восстановления нарушенной продукции слизи и/или для восстановления эпителиального барьера и/или для восстановления иммунной системы и/или для восстановления продукции антибактериальных соединений. Другой задачей изобретения является создание способа снижения проницаемости кишечника и/или восстановления нарушенной продукции слизи и/или восстановления эпителиального барьера и/или восстановления иммунной системы и/или восстановления продукции антибактериальных соединений у нуждающегося в этом субъекта, включающего введение эффективного или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту.

Таким образом, в настоящем изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для регуляции барьерной функции кишечника и к способ регуляции барьерной функции кишечника, включающий введение эффективного или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту. В одном из вариантов осуществления пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты регулируют толщину слизистого слоя (которая может уменьшаться при ожирении или других нарушениях обмена

веществ). В другом варианте осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов индуцирует продукцию противомикробных пептидов в толстой кишке, таких как, например, RegIIIgamma. В другом варианте осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов индуцирует продукцию соединений семейства эндоканнабиноидов, таких как, например, ацилглицерины, выбранные из группы, включающей 2-олеоилглицерин, 2-пальмитоилглицерин и 2-арахидоноилглицерин. В другом варианте осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов регулирует циркуляцию слизи.

В изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для применения при лечении метаболической дисфункции, связанной с нарушением обмена веществ или вызванной нарушением обмена веществ. Соответственно, еще одной задачей изобретения является создание способа лечения метаболической дисфункции, связанной с нарушением обмена веществ или вызванной нарушением обмена веществ, у нуждающегося в этом субъекта, включающего введение эффективного количества или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекта.

Заявителем также продемонстрировано, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* регулирует откладывание жира и жировой обмен. Соответственно, в изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для применения при регуляции откладывания жира и жирового обмена. Другой задачей изобретения также является создание способа регуляции откладывания жира и жирового обмена, включающего введение эффективного количества или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту. В одном из вариантов осуществления эта регуляция не предусматривает какого-либо изменения в приеме пищи. В одном из вариантов осуществления изобретения введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов устраняет метаболическую эндотоксемию. В другом варианте осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов уменьшает жировую массу. В другом варианте осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов увеличивает экспрессию мРНК маркеров дифференцировки адипоцитов и окисления липидов предпочтительно без влияния на липогенез.

В настоящем изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для применения при регуляции жирового обмена и гомеостаза глюкозы; и способ регуляции жирового обмена и гомеостаза глюкозы, включающий введение эффективного количества или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту. В одном из вариантов осуществления изобретения введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов устраняет гипергликемию натощак, связанную с пищевым рационом.

В другом варианте осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов вызывает уменьшение по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% экспрессии печеночной глюкозо-6-фосфатазы. В другом варианте осуществления введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов вызывает снижение индекса инсулинорезистентности. В одном из вариантов осуществления указанное снижение индекса инсулинорезистентности составляет по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50%.

Заявителем продемонстрировано, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* снижает непереносимость глюкозы и инсулинорезистентность у мышей, получающих рацион с высоким содержанием жиров. Соответственно, в настоящем изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для снижения непереносимости глюкозы и/или инсулинорезистентности; и способ снижения непереносимости глюкозы и/или инсулинорезистентности, включающий введение эффективного количества или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту.

В настоящем изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для лечения воспаления, предпочтительно незначительного воспаления, связанного с нарушениями обмена веществ или вызванного нарушениями обмена веществ; и способ лечения воспаления, связанного с нарушениями обмена веществ, включающий введение эффективного количества или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту.

Заявителем продемонстрировано, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* снижает уровни триглицеридов в плазме у получавших лечение мышей. Соответственно, в настоящем изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для снижения уровней триглицеридов в плазме; и способ снижения уровней триглицеридов в плазме, включающий введение эффективного количества или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту.

В настоящем изобретении также предложены пастеризованные *Akkermansia muciniphila* или их фрагменты для снижения уровня холестерина в плазме; и способ снижения уровня холестерина в плазме,

включающий введение эффективного количества или косметически эффективного количества пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов нуждающемуся в этом субъекту.

В одном из вариантов осуществления изобретения введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов субъекту не влияет на потребление пищи данным субъектом.

В одном из вариантов осуществления изобретения введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов субъекту увеличивает потребление энергии указанным субъектом предпочтительно без воздействия на потребление им пищи.

Таким образом, в настоящем изобретении также предложен способ увеличения потребления энергии субъектом, включающий введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов или композиции, фармацевтической композиции, косметической композиции или лекарственного средства согласно изобретению субъекту предпочтительно в терапевтически или косметически эффективном количестве. Способ согласно изобретению предпочтительно не включает или дополнительно не включает модулирование приема пищи субъектом. В одном из вариантов осуществления изобретения способ согласно изобретению увеличивает потребление энергии, вызывая тем самым долговременное снижение веса у субъекта и лечение нарушений обмена веществ у указанного субъекта, таких как, например, нарушения обмена веществ, связанные с ожирением.

В одном из вариантов осуществления введения пастеризованных *Akkermansia muciniphila* или их фрагментов субъекту усиливает ощущение сытости у указанного субъекта. Соответственно, согласно этому варианту осуществления способ согласно изобретению усиливает ощущение сытости у субъекта, вызывая тем самым долговременное снижение веса у субъекта и лечение нарушений обмена веществ у указанного субъекта, таких как, например, нарушения обмена веществ, связанные с ожирением.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан набор гистограмм, иллюстрирующих, что *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде на основе слизи или в среде, не содержащей слизи, противодействует увеличению прироста массы тела и увеличению жировой массы у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров. Кроме того, воздействие пастеризованных *Akkermansia muciniphila* на прирост массы тела и увеличение жировой массы является более сильным, чем у живых бактерий. (а) Общий прирост массы тела (г) у мышей, получавших контрольный рацион (CT ND), рацион с высоким содержанием жиров (CT HFD) и ежедневно получавших через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин, или у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров и ежедневно получавших через пероральный зонд живые *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде на основе слизи (HFD Akk M), среде, не содержащей слизи (HFD Akk G), или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде на основе слизи и пастеризованные (HFD Akk P) в течение 4 недель (n=8-10) (10^8 бактериальных клеток, суспендированных в 150 мкл стерильного анаэробного PBS). (б) Общее увеличение жировой массы (г), измеренное методом ядерного магнитного резонанса с разрешением по времени (n=8-10). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия (P<0,05) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 2 показана гистограмма, иллюстрирующая нормализацию индекса ожирения мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, после лечения *Akkermansia muciniphila*. Индекс ожирения (г), показанный как прибавление веса эпидидимальных, подкожных и брыжеечных жировых отложений (n=8-10). Данные представлены как среднее \pm SEM. *соответствует значению P<0,05 при сравнении двух условий с непарным двухсторонним t-критерием Стьюдента.

На фиг. 3 показан набор графиков, иллюстрирующих уменьшение непереносимости глюкозы у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, после введения пастеризованных *Akkermansia muciniphila* в большей степени, чем после введения живых *Akkermansia muciniphila*, выращенных в среде на основе слизи или среде, не содержащей слизи. (а) Профиль содержания глюкозы в плазме после перорального введения 2 г/кг глюкозы мышам, не ограниченным в движении (n=8-10). (б) Средняя площадь под кривой (AUC), измеренная в период между -30 и 120 мин после нагрузки глюкозой (n=8-10). (в) Индекс инсулинорезистентности, определенный путем умножения AUC содержания глюкозы в плазме (от -30 до 120 мин) на AUC содержания инсулина в плазме (от -30 до 15 мин) (n=8-10). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия (P<0,05) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 4 показана гистограмма, иллюстрирующая модуляцию экспрессии маркеров целостности кишечника и коррекцию вызванной рационом с высоким содержанием жиров метаболической эндотоксемии после введения живых или пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, выращенных в среде, не содержащей слизи. (а) Экспрессия мРНК Ocln, Cldn3 и Lyzl в тощей кишке (n=7-10), (б) экспрессия мРНК Ocln, Cldn3 и Lyzl в подвздошной кишке (n=7-10), (в) Уровни липополисахаридов в плазме (ед. эндотоксина/мл) (n=5-9). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия (P<0,05) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 5 показан набор гистограмм, иллюстрирующих уменьшение прироста массы тела и увели-

чения жировой массы после введения пастеризованных *Akkermansia muciniphila* в большей степени, чем после введения живых *Akkermansia muciniphila*, выращенных в среде, не содержащей слизи. (а) Общий прирост массы тела (г) у мышей, получавших контрольный рацион (СТ ND), рацион с высоким содержанием жиров (СТ HFD) и ежедневно получавших через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин, или у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров и ежедневно получавших через пероральный зонд живые *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи (HFD Akk G), или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде на основе слизи (HFD Akk P) (n=16-19) и пастеризованные в течение 5 недель ($2,10^8$ бактериальных клеток, суспендированных в 150 мкл, стерильного анаэробного PBS). (б) Общее увеличение жировой массы (г), измеренное методом ядерного магнитного резонанса с разрешением по времени (n=16-19). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 6 показана гистограмма, иллюстрирующая снижение индекса ожирения после введения пастеризованных *Akkermansia muciniphila* в большей степени, чем после введения живых *Akkermansia muciniphila*, выращенных в среде, не содержащей слизи. Индекс ожирения (г), показанный как общий вес эпидидимальных, подкожных и брыжеечных жировых отложений (n=16-19). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 7 показан набор гистограмм, иллюстрирующих, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* противодействует непереносимости глюкозы у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров в большей степени, чем введение живых *Akkermansia muciniphila*. Мыши получали контрольный рацион (СТ ND), рацион с высоким содержанием жиров (СТ HFD) и ежедневно получали через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, живые (HFD Akk G) или пастеризованные (HFD Akk P) в течение 5 недель. (а) Профиль содержания глюкозы в плазме после перорального введения 2 г/кг глюкозы мышам, не ограниченным в движении (n=8-10). Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Бонферрони. (б) Средняя площадь под кривой (AUC), измеренная в период между -30 и 120 мин после нагрузки глюкозой (n=10). (в) Индекс инсулинорезистентности, определенный путем умножения AUC содержания глюкозы в плазме (от -30 до 120 мин) на AUC содержания инсулина в плазме (от -30 до 15 мин) (n=8-10). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 8 показан набор графиков, иллюстрирующих, что введение живых или пастеризованных *Akkermansia muciniphila* противодействует непереносимости глюкозы и инсулинорезистентности у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров. (а) Профиль содержания глюкозы в плазме после перорального введения 2 г/кг глюкозы мышам, не ограниченным в движении (n=8-10). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Бонферрони. (б) Средняя площадь под кривой (AUC), измеренная в период между -30 и 120 мин после нагрузки глюкозой (n=8-10). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки. (в) Соотношение между контрольным (-) и стимулированным инсулином (-) p-IR β при регулировании нагрузки, измеренный путем денситометрии. (д) Соотношение между контрольным (-) и стимулированным инсулином (+) p-Akt^{thr308} при регулировании нагрузки, измеренный путем денситометрии. (е) Соотношение между контрольным (-) и стимулированным инсулином (+) p-Akt^{ser473} при регулировании нагрузки, измеренный путем денситометрии. (с) n=3-5. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Бонферрони.

На фиг. 9 показаны фотография (а) и гистограмма (б), иллюстрирующие, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* противодействует воздействию рациона с высоким содержанием жиров на средний диаметр адипоцитов. Мыши получали контрольный рацион (СТ ND), рацион с высоким содержанием жиров (СТ HFD) и ежедневно получали через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, живые (HFD Akk G) или пастеризованные (HFD Akk P) в течение 5 недель. (а) Репрезентативная картина окраски подкожных отложений жировой ткани гематоксилином и эозином. Шкала отсчета: 100 мкм. (б) Средний диаметр адипоцитов (мкм), определенный путем гистологического анализа (n=16-19). (в) Уровни лептина в плазме, измеренные в воротной вене (нг/мл) (n=8-10). Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P<0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 10 показана гистограмма, иллюстрирующая снижение уровней триглицеридов в плазме по-

сле введения пастеризованных *Akkermansia muciniphila*. Мыши получали контрольный рацион (СТ ND), рацион с высоким содержанием жиров (СТ HFD) и ежедневно получали через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, живые (HFD Akk G) или пастеризованные (HFD Akk P) в течение 5 недель (n=16-19). Данные представлены как среднее \pm SEM. Значение P указано при сравнении двух условий с непарным двухсторонним t-критерием Стьюдента (*: $P < 0,05$).

На фиг. 11 показана гистограмма, иллюстрирующая, что введение живых или пастеризованных *Akkermansia muciniphila* значительно снижает уровень холестерина ЛПВП в сыворотке крови и приводит к аналогичной тенденции в случае холестерина ЛПНП. Уровни холестерина ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП в плазме определены методом жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ). Мыши получали контрольный рацион (СТ ND), рацион с высоким содержанием жиров (СТ HFD) и ежедневно получали через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, живые (HFD Akk G) или пастеризованные (HFD Akk P) в течение 5 недель (n=8-10). Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P < 0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Бонферрони.

На фиг. 12 показана гистограмма, иллюстрирующая, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* увеличивает энергию, выделяемую с фекалиями. Выделяемая с фекалиями энергия измерена методом косвенной бомбовой калориметрией (ккал/г фекалий) (n=5). Мыши получали контрольный рацион (СТ ND), рацион с высоким содержанием жиров (СТ HFD) и ежедневно получали через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, живые (HFD Akk G) или пастеризованные (HFD Akk P) в течение 5 недель. Данные представлены как среднее \pm SEM. Данные с различными надстрочными буквами имеют значимые различия ($P < 0,05$) согласно однофакторному дисперсионному анализу и последующему апостериорному тесту Тьюки.

На фиг. 13 показан график, иллюстрирующий, что введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* вызывает большую коррекцию вызванного рационом с высоким содержанием жиров сдвига профиля метаболизма мочи в организме-хозяине, чем введение живых *Akkermansia muciniphila*. (a) График оценок метаболического профиля мочи (n=5-7) путем дискриминантного анализа методом ортогональных частных наименьших квадратов (от английского - Orthogonal Partial Least Squares discriminant analysis или OPLS-DA). (b) Влияние всех лечебных средств на прогнозирующий компонент 1 OPLS-DA. Мыши получали контрольный рацион (СТ ND), рацион с высоким содержанием жиров (СТ HFD) и ежедневно получали через пероральный зонд стерильный анаэробный PBS, содержащий глицерин или *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, живые (HFD Akk G) или пастеризованные (HFD Akk P) в течение 5 недель.

На фиг. 14 показан набор графиков, иллюстрирующих оценку безопасности *Akkermansia muciniphila* после перорального введения пациентам с избыточным весом/ожирением (n=5). (A-C) Маркеры, связанные с воспалением и гематологией: (A) С-реактивный белок (мг/дл), (B) общее количество лейкоцитов (10^3 клеток мкл), (C) протромбиновое время (сек). (D-F) Маркеры, связанные с функцией почек: (D) мочевины (мг/дл), (E) креатинин (мг/дл), (F) скорость клубочковой фильтрации (мл/мин * $1,73 \text{ м}^2$). (G-I). Маркеры, связанные с функцией печени: (г) активность аланиновой трансаминазы (МЕ/л), (H) активность аспартиновой трансаминазы (МЕ/л), (I) активность γ -глутамилтранспептидазы (МЕ/л). (J-K) Маркеры, связанные с функцией мышц: (J) активность креатинин-киназы (МЕ/л), (K) активность лактатдегидрогеназы (МЕ/л).

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами.

Ранее авторами было показано, что ежедневное введение *Akkermansia muciniphila* мышам, которые получали рацион с высоким содержанием жиров, может препятствовать развитию ожирения (WO 2014/076246).

Чтобы определить, применимы ли эти результаты к клиническим условиям, было решено оценить, сохранится ли действие *Akkermansia muciniphila* при культивировании в не содержащей слизи среде, применимой для испытаний на человеке. Более того, полученные авторами ранее результаты показывают, что стерилизация *Akkermansia muciniphila* в автоклаве уничтожает их воздействие на алиментарное ожирение. Соответственно, авторы имели целью исследовать последствия другого метода инактивации (т.е. пастеризации) на опосредованное *Akkermansia muciniphila* действие.

Материалы и методы.

Мыши.

Первый эксперимент.

Содержали 10-недельных мышей линии C57BL/6J (50 мышей, n=10/группа) (Charles River, Л'Арбрель, Франция) в контролируемой среде (при 12-часовом цикле дневного света с исключением освещения в 6 ч вечера) группами по две мыши в клетке со свободным доступом к пище и воде. Мыши получа-

ли контрольный рацион (ND) (AIN93Mi, Research diet, Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США) или рацион с высоким содержанием жиров (HFD) (60% жира и 20% углеводов (ккал/100 г) D12492i, Research diet, Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США).

Мышам через пероральный зонд ежедневно вводили *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде на основе муцина (HFD Akk M) или среде, не содержащей слизи (HFD Akk G), в дозе $2,10^8$ КОЕ/0,15 мл, суспендированной в стерильном анаэробном забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS). Кроме того, одной группе мышей ежедневно перорально вводили *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, и инактивированные путем пастеризации (HFD Akk P). Животные в контрольных группах через пероральный зонд получали эквивалентный объем стерильного анаэробного PBS (СТ ND и СТ HFD) с аналогичной конечной концентрацией глицерина (2,5% по объему). Продолжали лечение в течение 4 недель.

Культивировали *Akkermansia muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) для группы HFD Akk M в анаэробных условиях в базальной среде на основе муцина, как описано ранее (Derrien и др., 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1469-1476). Затем промыли культуры и суспендировали в анаэробном PBS, содержащем 25% по объему глицерина, до конечной концентрации $1,10^{10}$ КОЕ/мл.

Культивировали *Akkermansia muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) для группы HFD Akk G в анаэробных условиях в среде, не содержащей слизи. Затем промыли культуры и суспендировали в анаэробном PBS, содержащем 25% по объему глицерина, до конечной концентрации $1,10^{10}$ КОЕ/мл.

Культивировали *Akkermansia muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) для группы HFD Akk P в анаэробных условиях в среде, не содержащей слизи. Затем промыли культуры и суспендировали в анаэробном PBS, содержащем 25% по объему глицерина, до конечной концентрации $1,10^{10}$ КОЕ/мл. Затем в течение 30 мин пастеризовали пробирки на водяной бане при температуре 70°C.

Раз в неделю регистрировали массу тела, потребление корма и воды. Оценили состав тела путем ядерного магнитного резонанса с разрешением по времени на 7,5 МГц (TD-NMR) (LF50 minispec, Bruker, Райнштеттен, Германия).

Второй эксперимент.

Содержали 10-недельных мышей линии C57BL/6J (40 мышей, n=10/группа) (Charles River, Л'Арбрель, Франция) в контролируемой среде (при 12-часовом цикле дневного света с выключением освещения в 6 ч вечера) группами по две мыши в клетке со свободным доступом к пище и воде. Мыши получали контрольный рацион (ND) (AIN93Mi, Research diet, Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США) или рацион с высоким содержанием жиров (HFD) (60% жира и 20% углеводов (ккал/100 г) D12492i, Research diet, Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США).

Мышам через пероральный зонд ежедневно вводили *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи (HFD Akk G), живые или пастеризованные (HFD Akk G и HFD Akk P), в дозе $2,10^8$ КОЕ/0,15 мл, суспендированной в стерильном анаэробном фосфатном буферном физиологическом растворе. Животные в контрольных группах через пероральный зонд получали эквивалентный объем стерильного анаэробного фосфатного буферного физиологического раствора (СТ ND и СТ HFD). Продолжали лечение в течение 5 недель.

Культивировали *Akkermansia muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) для группы HFD Akk G в анаэробных условиях в среде, не содержащей слизи. Затем промыли культуры и суспендировали в анаэробном PBS, содержащем 25% по объему глицерина, до конечной концентрации $1,10^{10}$ КОЕ/мл.

Культивировали *Akkermansia muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) для группы HFD Akk P в анаэробных условиях в среде, не содержащей слизи. Затем промыли культуры и суспендировали в анаэробном PBS, содержащем 25% по объему глицерина, до конечной концентрации $1,10^{10}$ КОЕ/мл. Затем в течение 30 мин пастеризовали пробирки на водяной бане при температуре 70°C.

Раз в неделю регистрировали массу тела, потребление корма и воды. Оценили состав тела путем ядерного магнитного резонанса с разрешением по времени на частоте 7,5 МГц (TD-NMR) (LF50 minispec, Bruker, Райнштеттен, Германия).

Собрали свежие образцы мочи в течение последней недели лечения и хранили при -80°C до проведения анализа. Измерили содержание энергии, выделяемой с фекалиями, в образцах фекалий, собранных через 24 ч в течение последней недели лечения, с помощью бомбового калориметра (Mouse Clinical Institute, 67404 Илькирш, Франция).

Третий эксперимент.

Содержали 10-недельных мышей линии C57BL/6J (40 мышей, n=10/группа) (Charles River, Л'Арбрель, Франция) в контролируемой среде (при 12-часовом цикле дневного света с выключением освещения в 6 ч вечера) группами по две мыши в клетке со свободным доступом к пище и воде. Мыши получали контрольный рацион (ND) (AIN93Mi, Research diet, Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США) или рацион с высоким содержанием жиров (HFD) (60% жира и 20% углеводов (ккал/100 г) D12492i, Research diet, Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США).

Мышам через пероральный зонд ежедневно вводили *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи (HFD Akk G), живые или пастеризованные (HFD Akk G и HFD Akk P), в дозе $2,10^8$ КОЕ/0,15 мл, суспендированной в стерильном анаэробном фосфатном буферном физиологическом рас-

творе. Животные в контрольных группах через пероральный зонд получали эквивалентный объем стерильного анаэробного фосфатного буферного физиологического раствора (СТ ND и СТ HFD). Продолжали лечение в течение 5 недель.

Все эксперименты на мышах были одобрены и выполнены в соответствии с рекомендациями местного комитета по этике. Условия содержания были установлены Бельгийским законом о защите лабораторных животных от 29 мая 2013 года в отношении (соглашение № LA1230314).

Пероральный тест на толерантность к глюкозе.

Мышам, не получавшим корма в течение 6 ч, через пероральный зонд ввели глюкозу (2 г глюкозы на кг массы тела). Измерили уровни глюкозы в крови до пероральной нагрузки глюкозой и через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после пероральной нагрузки глюкозой. Определили уровень глюкозы в крови с помощью глюкометра (Accu Check, Aviva, Roche) в образцах крови, взятых из кончика хвостовой вены.

Индекс инсулинорезистентности.

Определили содержание инсулина в 5 мкл плазмы с использованием набора ELISA (Merckodia) в соответствии с указаниями производителя. Определили индекс инсулинорезистентности путем умножения площади под кривыми содержания глюкозы в крови (от -30 до 120 мин) и содержания инсулина в плазме (-30 и 15 мин), полученными после перорального теста на толерантность к глюкозе.

Вестерн-блоттинг.

С целью анализа сигнального пути инсулина в третьем эксперименте отнесли мышей к подгруппе, получавшей инъекции физиологического раствора, или к подгруппе, получавшей инъекции инсулина, таким образом, чтобы подгруппы соответствовали друг другу с точки зрения массы тела и жировой массы животных. Затем через воротную вену ввели мышам 1 мг/г инсулин (Actrapid, Novo Nordisk A/S, Дания) под анестезией (изофлуран, Forene, Abbott, Квинборо, Кент, Англия) или равный объем физиологического раствора. Через три минуты после инъекции умертвили мышей, и быстро извлекли печень.

С целью обнаружения белков сигнального пути инсулина гомогенизировали ткани в буфере ERK (Triton X-100 0,1%, HEPES 50 mM, NaCl 5 M, глицерин 10%, MgCl₂ 1,5 mM и DTT 1 mM), дополненном коктейлем из ингибиторов протеазы и ингибиторов фосфатазы. Выделили равные количества белков путем SDS-PAGE и перенесли на нитроцеллюлозные мембраны. Инкубировали мембраны в течение ночи при 4°C с антителами, разбавленными трис-буферным физиологическим раствором Tween-20, содержащим 1% обезжиренного сухого молока: p-IRb (1:1,000, sc-25103, Санта-Крус, штат Калифорния, США), p-AktThr308 (1:1,000; #2965L, Cell Signaling, Данверс, штат Массачусетс, США) и p-AktSer473 (1:1,000; #4060L, Cell Signaling). Определили количество фосфопротеинов у 5 животных, получивших инъекцию инсулина, и у 5 животных, получивших инъекцию физиологического раствора, в каждой группе. Контрольной нагрузкой являлся β-актин (1:10000, ab6276).

Отбор образцов тканей.

Анестезировали животных изофлураном (Forene®, Abbott, Квинборо, Кент, Англия), и взяли кровь из воротной вены и полую вену. Затем умертвили мышей путем смещения шейных позвонков, и приступили к отбору образцов тканей. Точно иссекли и взвесили жировые отложения (эпидидимальные, подкожные и брыжеечные); увеличение веса отложений всех трех жировых тканей соответствует индексу ожирения. Погрузили кишечные сегменты (подвздошной кишки, слепой кишки и толстой кишки), содержащее слепую кишку и жировые отложения в жидкий азот и хранили при -80°C с целью дальнейшего анализа.

Гистологические анализы.

На 24 ч зафиксировали жировые ткани в 4% параформальдегиде при комнатной температуре. Затем на 24 ч погрузили образцы в этанол 100% до обработки с целью заливки в парафин. Окрасили залитые в парафин срезы тканей толщиной 5 мкм гематоксилином и эозином. Получили изображения с помощью слайд-сканера SCN400 (Leica Biosystems, Вецлар, Германия). Случайным образом выбрали по 5 областей с большим увеличением для каждой мыши, и определили диаметр адипоцитов с использованием ImageJ (версия 1.50a, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд, США).

Выделение РНК и анализ методом кПЦР в реальном времени.

Выделили полную РНК из тканей с использованием реагента TriPure (Roche). Определили количества и осуществили анализ целостности полной РНК путем прогона 1 мкл каждого образца через биоанализатор Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent). Выделили кДНК путем обратной транскрипции 1 мкг полной РНК с использованием набора Reverse Transcription System (Promega, Лейден, Нидерланды). Осуществили ПЦР в режиме реального времени с помощью системы и программного обеспечения Biorad CFX (Biorad, Hercules, США) с использованием Mesa Fast qPCR (Eurogentec, Серен, Бельгия) для обнаружения в соответствии с указаниями производителя. В качестве гена "домашнего хозяйства" был выбран ген RPL19. Все образцы были протестированы в двух экземплярах на одном 96-луночном реакционном планшете, а анализ данных выполнялся в соответствии с методом 2^{ΔΔCT}. Проверили подлинность и чистоту амплифицированного продукта путем анализа кривой плавления в конце амплификации. Далее в табл. 1 представлены праймерные последовательности целевых генов мыши.

Таблица 1. Праймерные последовательности целевых генов мыши

Праймеры		Последовательность
RPL-19	Прямой	GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTC (SEQ ID NO:1)
	Обратный	CCTGTCTGCCTTCAGCTTGT (SEQ ID NO:2)
Ocln	Прямой	ATGTCCGGCCGATGCTCTC (SEQ ID NO:3)
	Обратный	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT (SEQ ID NO:4)
Cldn3	Прямой	TCATCGGCAGCAGCATCATCAC (SEQ ID NO:5)
	Обратный	ACGATGGTGATCTTGGCCTTGG (SEQ ID NO:6)
Lyz1	Прямой	GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG (SEQ ID NO:7)
	Обратный	CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG (SEQ ID NO:8)

Измерение триглицеридов в плазме.

Осуществили анализ образцов плазмы на триглицериды путем определения количества глицерина, образующегося в результате гидролиза триглицеридов, с использованием предлагаемого на рынке набора (DiaSys, Кондом, Франция).

Измерение лептина в плазме.

Осуществили анализ образцов плазмы на лептин с использованием набора для мультиплексного иммуноанализа (Merck Millipore, Brussels, Belgium) и определили его количество с использованием технологии Luminex (Bio-Rad, Бельгия) в соответствии с указаниями производителя.

Измерение холестерина в плазме (методом жидкостной экспресс-хроматографии белков).

Определили количество липопротеинов в плазме методом жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ, очиститель АКТА 10, GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США). Осуществили инъекцию 50 мкл образца плазмы и отделили липопротеины в колонке Superose™ 6 10/300 GL (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) с NaCl 0,15 М при pH 7,4 в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин, собрали эфлюент в виде 0,3-мл фракций, затем добавили холестерин, и определили содержание ТГ в каждой фракции, как описано выше. Определили количество холестерина в липопротеинах различных классов (ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП) путем измерения доли площади пика и умножения каждой доли процента на общее количество холестерина. Определили общий уровень холестерина в плазме с помощью предлагаемых на рынке наборов (CHOD-PAP, BIOLABO SA, Мези, Франция).

Измерение энергии, выделяемой с фекалиями.

Измерили энергию, выделяемую с фекалиями на образцах фекалий, собранных через 24 ч в течение последней недели лечения, с использованием бомбового калориметра (Mouse Clinical Institute, Илькирш, Франция).

Анализ метаболомики мочи.

Взяли образцы мочи мышей, и осуществили измерения на спектрометре (Bruker), работающем на частоте 600,22 МГц на частоте, в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Dona AC, 2014); затем обработали и проанализировали ¹H ЯМР-спектры, как описано ранее (Dumas и др., 2006. Proc. Natl. Акад. Sci. США. 103 (33):12511-6).

Определение количества липополисахаридов в плазме.

Определили содержание ЛПС в крови воротной вены с использованием системы Endosafe-Multi-Cartridge (Charles River Laboratories) хромогенным кинетическим методом с использованием лизата *Limulus amoebocyte* (LAL), согласно которому измеряется интенсивность цвета, непосредственно связанная с содержанием эндотоксина в образце. Разбавили образцы плазмы в соотношении 1/10 буферным раствором без эндотоксина, чтобы свести к минимуму помехи для реакции (подавление или усиление), и в течение 15 мин нагрели до 70°C. Разбавили каждый образец в соотношении 1/100, 1/150, 1/200 или 1/400 водой с LAL-реактивом без эндотоксина (Charles River Laboratories), подвергли обработке в двух экземплярах, и включили в анализ по два пика для каждого образца. Проверили все образцы на восстановление и отклонение коэффициента. Нижний предел обнаружения составлял 0,005 ед. эндотоксина/мл.

Определение температуры пастеризации и временного диапазона.

Погрузили на 15 с (0,25 мин), 2, 5, 15 и 30 мин пробирки, содержащие живые бактерии, в водяную баню с температурой, установленной на уровне 50, 60, 70, 80 или 90°C. Оценили инактивацию *Akkermansia muciniphila* путем помещения 50 мкл неразбавленного содержимого пробирок в среду из сердечно-мозгового экстракта (ВНИ) и агара, дополненную 5% слизи, и обнаружения присутствия колониеобразующих единиц (КОЕ) после 7 дней инкубации при 37°C в анаэробном контейнере. В качестве отрицательного контроля использовали содержимое стерилизованной в автоклаве пробирки, а в качестве положительного контроля использовали содержимое пробирки, которую не погружали в водяную баню. Провели этот эксперимент в два различных момента времени.

Среда на основе слизи.

Культивировали *Akkermansia muciniphila* в среде на основе слизи, промыли и концентрировали, как описано ранее (Everard и др., 2013). Proc. Natl. Акад. Sci. USA. 110:9066-9071). Помимо необработанной

партии клеток подвергли часть клеток мягкой термообработке путем 30-минутной инкубации при 70°C.

Среда, не содержащая слизи.

Культивировали *Akkermansia muciniphila* в не содержащей слизи базальной анаэробной среде, как описано ранее (Derrien и др., 2004). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1469-1476), содержащей 16 г/л соевого пептона, 25 mM глюкозы, 25 mM N-ацетилглюкозамина и 4 г/л L-треонина. Промыли и концентрировали клетки, как описано ранее (Everard и др., 2013. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110:9066-9071). Помимо необработанной партии клеток подвергли часть клеток мягкой термообработке путем 30-минутной инкубации при 70°C.

Оценка безопасности перорального введения живых и пастеризованных *Akkermansia muciniphila* добровольцам с избыточным весом или ожирением.

Представленные результаты представляют собой промежуточные отчеты о безопасности, полученные от 20 пациентов с избыточным весом и ожирением (индекс массы тела >25 кг/м²), у которых диагностирован метаболический синдром согласно определению NCEP ATP III (любые три из пяти следующих критериев: гликемия натощак >110 мг/дл, артериальное давление >130/85 мм рт. ст. или гипотензивная терапия, триглицеридемия натощак >150 мг/дл, холестерин ЛПВП <40 мг/дл для мужчин, 50 мг/дл для женщин и/или окружность талии >102 см для мужчин, 88 см для женщин). Пациенты были отобраны на добровольной основе в клинике Университета Сент-Люк, Брюссель, Бельгия в период между декабрем 2015 года и маем 2016 года. Они были отнесены к любой из групп методом рандомизованных блоков. Критерии исключения: наличие острых или хронических прогрессирующих или хронических нестабилизированных заболеваний, потребление алкоголя (>2 бокалов в день), предыдущая бариатрическая операция, любая операция за 3 месяца до начала исследования или запланированная в течение следующих 6 месяцев, беременность или беременность, планируемая в течение следующих 6 месяцев, регулярная физическая активность (более 30 мин занятий спортом 3 раза в неделю), потребление пищевых добавок (омега-3 жирных кислот, пробиотиков, пребиотиков, растительных станолов/стеролов) в течение месяца, предшествующего исследованию, воспалительное заболевание кишечника или синдром раздраженной толстой кишки, диабетическая желудочно-кишечная автономная невропатия (такая как, гастропарез или снижение моторики желудочно-кишечного тракта), потребление более 30 г пищевых волокон в день, вегетарианский или необычный пищевой рацион, непереносимость лактозы или аллергия на молочный белок, непереносимость клейковины, текущее лечение препаратами, влияющими на представляющие интерес параметры (понижающими уровень глюкозы препаратами, такими как метформин, ингибиторы DPP-4, агонисты рецепторов GLP-1, акарбоза, сульфонилмочевины, глиниды, тиазолидиндионы, ингибиторы SGLT2, инсулин, лактулоза, употребление антибиотиков в течение 2 месяцев, предшествующих исследованию, глюкокортикоиды, иммунодепрессанты, статины, фибраты, орлистат, холестирамин или эзетимиб) и исходный уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) >7,5%. Этические аспекты данного исследования одобрены Комиссией по биомедицинской этике лечебного факультета (Commission d'Éthique Biomédicale Hospitalo-facultaire) Католического Университета Луврена (Université catholique de Louvain) (Брюссель, Бельгия), и от каждого участника было получено письменное информированное согласие. Исследование зарегистрировано на сайте clinicaltrials.gov под номером NCT02637115.

Участникам назначили введение в течение 3 месяцев ежедневной дозы плацебо (эквивалентного объема стерильного PBS, содержащего глицерин), 10¹⁰ КОЕ живых *Akkermansia muciniphila* (Akk S - 10¹⁰), 10⁹ КОЕ живых *Akkermansia muciniphila* (Akk S - 10⁹) или 10¹⁰ КОЕ пастеризованных *Akkermansia muciniphila* (Akk P - 10¹⁰) (плацебо и бактерии имели качество пищевого продукта и были изготовлены в соответствии с надлежащей производственной практикой). Взяли образцы крови в начале лечения, часть которых была направлена в лабораторию больницы для определения соответствующих клинических параметров. В зависимости от клинического параметра использовались различные пробирки: пробирки с покрытием из ЭДТА для подсчета лейкоцитов, пробирки с покрытием из фторида натрия в случае гликемии натощак, пробирки с покрытием из цитрата для исследования свертывания крови и пробирки с покрытием из лития и гепарина для исследования мочевины и ферментативной активности. После 2 недель лечения пациенты вернулись в больницу для прохождения контрольного осмотра, во время которого у них взяли образцы крови, чтобы сравнить клинические параметры с исходными значениями.

Исследование являлось слепым для пациентов и врачей. На фиг. 14 и в табл. 3-5 число участников по группам составляет: группа плацебо: 5, группа Akk S - 10¹⁰: 5, группа Akk S - 10⁹: 5, групп Akk P - 10¹⁰: 5.

Данные представлены как среднее ±SEM. Различия между двумя группами оценивались с использованием непарного двухстороннего t-критерия Стьюдента. Наборы данных, касающихся более двух групп, оценивались путем дисперсионного анализа и последующего апостериорного теста Тьюки. Данные с различными надстрочными буквами значимо различаются при P<0,05 согласно апостериорному дисперсионному статистическому анализу. Данные анализировались с использованием GraphPad Prism версии 5.00 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, штат Калифорния, США). Результаты считались статистически значимыми при P<0,05.

Был проведен двухсторонний дисперсионный анализ повторных измерений эволюции гликемии во время перорального теста на толерантность к глюкозе (ПТТГ) с использованием апостериорного теста

Бонферрони с целью определения перераспределения холестерина в конкретных липопротеинах и осуществления вестерн-блоттинга.

Данные представлены как среднее \pm SD. Различия между группами оценивались с использованием теста Крускала-Уоллиса. Различия между исходными значениями и значениями, полученными при контрольном осмотре, оценивались с использованием знакового рангового критерия Уилкинсона для связанных выборок. Данные анализировались с использованием GraphPad Prism версии 7.00 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, штат Калифорния, США). Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты.

Эксперименты *in vitro*.

Чтобы оптимизировать протокол пастеризации, сначала в течение различного времени инкубировали пробирки, содержащие *Akkermansia muciniphila*, в водяных банях при температурах, установленных в определенном диапазоне. Пастеризация считалась эффективной, если не наблюдалось бактерий после посева содержимого обработанной пробирки на чашки с питательной средой (табл. 2).

Таблица 2

Время воздействия (мин)	Температура (°C)				
	50	60	70	80	90
0,25	Живые	Живые	Живые	Живые	Живые
2	Живые	Живые	Живые	Инактивированные	Инактивированные
5	Живые	Живые	Пограничные	Инактивированные	Инактивированные
15	Живые	Пограничные	Пограничные	Инактивированные	Инактивированные
30	Пограничные	Инактивированные	Инактивированные	Инактивированные	Инактивированные

Сочетания температур и времени воздействия, испытанные при пастеризации. "Живые" соответствует чашкам, в которых получено большое число КОЕ. "Пограничные" соответствует чашкам, в которых наблюдалось от 1 до 3 КОЕ. "Инактивированные" соответствует чашкам, в которых КОЕ не наблюдались.

Для дальнейших экспериментов выбрали пастеризацию в течение 30 мин при 70°C. Помимо жизнеспособности испытали влияние пастеризации на активность двух фукозидаз и двух сульфатаз *Akkermansia muciniphila* (закодированных генами Amuc_0010, Amuc_0146, Amuc_0121 и Amuc_1074; van Passel и др., 2011. PLoS One. 6(3):e16876). Эти ферменты имеют отношение к распаду муцина. С этой целью вызвали сверхэкспрессию их генов в *Escherichia coli* с помощью His-tag на C-конце (Tailford и др., 2015). Nat. Commun. 6:7624), и использовали очищенные белки для анализа. Определили активность ферментов за 30 мин до и через 30 мин после при 70°C, и в результате этой обработки достигалась более чем 20-кратная инактивация ферментативной активности.

Эксперименты *in vivo*.

В первой серии экспериментов через пероральный зонд ежедневно вводили мышам, получавшим рацион с высоким содержанием жиров, живые *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде на основе слизи и в среде, не содержащей слизи. Другой группе мышей через пероральный зонд вводили *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи и инактивированные путем пастеризации (30 мин при 70°C). Использовали мышей, получавших стандартный корм, в качестве контрольной группы. Лечение проводилось в течение 4 недель.

Авторы наблюдали, что лечение живыми *Akkermansia muciniphila* снижает вес и уменьшает прирост жировой массы вследствие рациона с высоким содержанием жиров независимо от используемой среды для выращивания (фиг. 1a-b). Пастеризованные *Akkermansia muciniphila* неожиданно оказывали более сильное воздействие, чем живые бактерии, поскольку у мышей, получавших пастеризованные бактерии, наблюдалась такой же прирост массы тела и жировой массы, как и у мышей, который получали контрольный рацион (фиг. 1a-b). У мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров (фиг. 2), значительно увеличился индекс ожирения, представленный как сумма подкожных, висцеральных и эпидидимальных жировых отложений. Введение *Akkermansia muciniphila* в одинаковой степени противодействовало этому увеличению независимо от среды для выращивания или пастеризации.

Затем были подтверждены наши предыдущие результаты, касающиеся толерантности к глюкозе. Действительно, рацион с высоким содержанием жиров приводит к усилению гликемии по данным перорального теста на толерантность к глюкозе (ПТТГ), в результате чего значительно увеличивается площадь под кривой (AUC), измеренная в период, начиная за 30 мин до и заканчивая через 120 мин после введения глюкозы (фиг. 3a-b). Введение *Akkermansia muciniphila* уменьшает это усиление, что приводит к получению промежуточных значений AUC и в этом случае независимо от среды для выращивания и пастеризации.

С учетом инсулинемии мышей индекс инсулинорезистентности у мышей, которые получали рацион с высоким содержанием жиров, был значительно выше, чем у контрольных мышей (фиг. 3c). При введении *Akkermansia muciniphila*, выращенных в среде на основе слизи, индексы инсулинорезистентности (IR) имели величины в промежутке между величинами у контрольных мышей и у нелеченых мышей,

получавших рацион с высоким содержанием жиров. Однако, хотя индекс ИР мышей, получавших *Akkermansia muciniphila*, выращенные на среде, не содержащей слизи, был на 15% ниже, чем у нелеченых мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, он все же был значительно выше, чем у контрольных мышей, тогда как пастеризованные *A. muciniphila* полностью нормализовали индекс ИР у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров (фиг. 3с), что тем самым демонстрирует, что пастеризация усиливает воздействие *Akkermansia muciniphila* на толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность.

Ранее авторами было обнаружено, что лечение с помощью *Akkermansia muciniphila* может влиять на барьерную функцию кишечника путем модуляции продукции противомикробных пептидов и регуляции толщины слоя слизи. С целью дальнейшего улучшения нашего понимания взаимовлияния *Akkermansia muciniphila* и кишечного барьера авторы определили экспрессию двух маркеров плотно контактирующих кишечных белков, а именно Ocln и Cldn3, кодирующих белки Occludin и Claudin 3; а также Lyzl, кодирующего противомикробный пептид Lysozyme 1. Лечение мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, живыми или пастеризованными *Akkermansia muciniphila* увеличивало экспрессию Ocln в тощей кишке, тогда как пастеризованные *Akkermansia muciniphila* специфически увеличивали экспрессию Lyzl (фиг. 4а). Лечение живыми и пастеризованными *Akkermansia muciniphila* увеличивало экспрессию Cldn3 и Lyzl в подвздошной кишке (фиг. 4б). Результатом этих воздействий на маркеры целостности кишечника является полная нормализация ЛПС в плазме у леченых мышей (фиг. 4с), что демонстрирует, что *Akkermansia muciniphila* как в живой, так и пастеризованной форме могут усиливать кишечный барьер и уменьшать метаболическую эндотоксемию.

Во второй и третьей сериях экспериментов вводили мышам, получавшим рацион с высоким содержанием жиров, живые или пастеризованные *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, чтобы подтвердить полученные выше результаты. Использовали мышей, получавших стандартный корм, в качестве контрольной группы, и проводили лечение в течение пяти недель. Введение *Akkermansia muciniphila*, выращенных в среде, не содержащей слизи, приводило к снижению на 10-15% массы тела, прироста массы жировой ткани и индекса ожирения у мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, хотя и не достигало статистической значимости (фиг. 5 и 6). Введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* полностью нормализовало эти параметры, что еще раз демонстрирует их более сильный эффект после пастеризации.

Аналогичные результаты были также получены в отношении толерантности к глюкозе и инсулинорезистентности. Действительно, если AUC у нелеченых мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, увеличивалась в ходе ПТТГ (фиг. 7а-б), лечение живыми или пастеризованными *Akkermansia muciniphila* нормализовало этот параметр. Индекс ИР у мышей, получавших *Akkermansia muciniphila*, выращенные в среде, не содержащей слизи, был на 20% ниже, чем у нелеченых мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, но все же значительно выше, чем у контрольных мышей. Однако лечение пастеризованными *Akkermansia muciniphila* полностью нормализовало индекс ИР с его двукратным уменьшением по сравнению с нелеченой группой, получавшей рацион с высоким содержанием жиров (фиг. 7с).

Хотя в третьей серии экспериментов AUC у нелеченых мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, увеличивалась в ходе ПТТГ, лечение живыми или пастеризованными *Akkermansia muciniphila* значительно уменьшало AUC, что демонстрирует улучшение толерантности к глюкозе (фиг. 8а-б). Чтобы дополнительно исследовать воздействие *Akkermansia muciniphila* на инсулинорезистентность, помимо ПТТГ были проанализировано индуцированное инсулином фосфорилирование инсулинового рецептора (IR) и его нисходящего медиатора Akt в печени на участках треонина (Akt^{thr}) и серина (Akt^{ser}) после инъекции инсулина или физиологического раствора в воротную вену (фиг. 8с-е). Как описано выше, у нелеченых мышей, получавших рацион с высоким содержанием жиров, фосфорилирование всех оцениваемых белков уменьшалось по сравнению с мышами из группы CT ND, достигая значимости для Akt^{thr} (фиг. 8д). Лечение *Akkermansia muciniphila* имело тенденцию противодействовать этим эффектам при значительно более высоких уровнях p- Akt^{ser} у мышей, получавших живые бактерии (фиг. 8е), по сравнению с нелечеными мышами, получавшими рацион с высоким содержанием жиров.

Затем измерили средний диаметр адипоцитов в подкожном жировом отложении, поскольку он, как известно, увеличивается при ожирении и способствует развитию воспаления и инсулинорезистентности (Rosen and Spiegelman, 2014). Cell. 156:20-44). В соответствии с литературой было обнаружено, что рацион с высоким содержанием жиров приводит к увеличению диаметра. Лечение живыми *Akkermansia muciniphila*, выращенными в среде, не содержащей слизи, не влияло на увеличенный диаметр, вызванный рационом с высоким содержанием жиров. Однако введение пастеризованных *Akkermansia muciniphila* восстанавливало диаметр до уровней, сходных с контрольными мышами (фиг. 9а-б). Лечение пастеризованными *Akkermansia muciniphila* также нормализовало содержание лептина, и его уровень был сходен с уровнем у контрольных мышей (фиг. 9с).

Следующий проанализированный параметр касался дислипидемии, вызванной рационом с высоким содержанием жиров. Было оценено воздействие *Akkermansia muciniphila* на гипертриглицеридемию и гиперхолестеринемию, что связано с атеросклерозом и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Хотя ме-

жду контрольными и нелечеными мышами, получавшими рацион с высоким содержанием жиров, не наблюдалось различий, было замечено, что лечение пастеризованными *Akkermansia muciniphila* приводит к значительному снижению (на 15-20%) уровней триглицеридов в плазме (фиг. 10). Что касается содержания холестерина в плазме, лечение живыми или пастеризованными *Akkermansia muciniphila* корректировало вызванную рацион с высоким содержанием жиров гиперхолестеринемию со значительным снижением уровня холестерина ЛПВП в плазме и аналогичной тенденцией у холестерина ЛПНП (фиг. 11).

С целью дальнейшего объяснения того, как живые и пастеризованные *Akkermansia muciniphila* уменьшают массу тела и прирост жировой массы, не влияя на потребление пищи при рационе с высоким содержанием жиров, было измерено содержание калорий, выделяемых с фекалиями, и обнаружено, что оно значительно увеличивалось у мышей, получавших пастеризованные *Akkermansia muciniphila*, но не живые *Akkermansia muciniphila* (фиг. 12). Эти результаты предполагают снижение поглощения энергии и, следовательно, выделение энергии с фекалиями после введения пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, что, по меньшей мере, частично, объясняет более сильные наблюдаемые воздействия пастеризованных *Akkermansia muciniphila*.

Затем было оценено, может ли лечение с *Akkermansia muciniphila* уменьшать вызванный рацион с высоким содержанием жиров сдвиг профиля метаболизма мочи в организме-хозяине. Рацион с высоким содержанием жиров являлся основным фактором, влияющим на нецелевые метаболические профили на основе ЯМР по первой шкале анализа методом O-PLS-DA (Tpred1), в то время как данные лечения пастеризованными *Akkermansia muciniphila* сгруппированы отдельно от всех других групп по второй шкале (Tpred2, фиг. 13). Это привело к нормализации вызванного рацион с высоким содержанием жиров сдвига на 37% в случае пастеризованных бактерий и на 17% в случае живых бактерий (фиг. 13).

Эти данные в целом предполагают, что воздействия *Akkermansia muciniphila* на метаболизм в организме-хозяине в основном сходны независимо от используемой среды для выращивания. Более удивительно, что они также демонстрируют, что пастеризация усиливает воздействия *Akkermansia muciniphila*. Это представляет наибольший интерес, поскольку пастеризация может уменьшить проблемы биобезопасности, связанные с применением живых бактерий, с одновременным повышением эффективности *Akkermansia muciniphila* при лечении ожирения и связанных с ним нарушений.

Оценка безопасности перорального введения живых и пастеризованных *Akkermansia muciniphila* добровольцам с избыточным весом или ожирением.

Оценили безопасность и переносимость перорального введения *Akkermansia muciniphila* добровольцам с избыточным весом и ожирением, получавшим различные дозы живых *Akkermansia muciniphila* (Akk S - 10^{10} и Akk S - 10^9) или пастеризованных *Akkermansia muciniphila* (Akk P - 10^{10}) в рамках продолжающегося клинического исследования с целью испытания эффективности этих бактерий в отношении метаболического синдрома. В табл. 3 приведены антропоморфные характеристики пациентов в начале исследования.

Таблица 3. Описательные характеристики всех участников клинического исследования (n=5) в начале лечения

	Плацебо	Akk S - 10^{10}	Akk S - 10^9	Akk P - 10^{10}
Пол (М/Ж)	¼	3/2	2/3	2/3
Возраст (годы)	53,00 ± 10,98	50,40 ± 4,72	50,60 ± 6,69	52,40 ± 7,99
Вес тела (кг)	102,60 ± 13,53	111,10 ± 19,52	103,80 ± 17,03	122,50 ± 12,67
Индекс массы тела (кг/м ²)	35,84 ± 5,98	38,48 ± 5,37	36,30 ± 3,12	40,71 ± 5,71
Окружность талии (см)	116,60 ± 13,03	119,50 ± 12,35	115,60 ± 7,20	124,90 ± 8,10
Гликемия натощак (мг/дл)	100,50 ± 10,52	96,13 ± 2,24	108,30 ± 12,91	106,30 ± 11,80

Проанализировали несколько клинических параметров, исследованных при оценке безопасности пробиотиков (Jones и др., 2012. Food. Chem. Toxicol. 50:2216-2223; Burton и др., 2011. Food Chem. Toxicol. 49(9):2356-64; Wind и др., 2010. Br. J. Nutr. 104 (12):1806-16) до и через две недели после начала лечения. При любом составе *Akkermansia muciniphila* (фиг. 14А-К и табл. 4) не наблюдалось каких-либо значимых изменений маркеров, связанных с воспалением и гематологией, почками, печенью и мышечной функцией.

Таблица 4. Описательные характеристики всех участников клинического исследования (n=5) в начале лечения

	Плацебо		Акк S - 10 ¹⁰		Акк S - 10 ⁹		Акк P - 10 ⁹	
	Базис	Безопасный уровень	Базис	Безопасный уровень	Базис	Безопасный уровень	Базис	Безопасный уровень
Воспаление и гематология								
С-реактивный белок (мг дл ⁻¹)	3,60 ± 1,67	4,40 ± 2,07	6,60 ± 5,18	6,40 ± 6,07	6,60 ± 5,18	6,40 ± 6,07	11,40 ± 14,33	15,20 ± 17,38
Лейкоциты (10 ³ мкл ⁻¹)	6,43 ± 1,49	7,07 ± 1,68	7,91 ± 4,08	8,36 ± 4,17	7,91 ± 4,08	8,36 ± 4,17	6,89 ± 2,44	8,20 ± 1,61
Протромбиновое время (сек)	11,38 ± 0,55	11,14 ± 0,44	10,92 ± 0,73	11,12 ± 0,80	10,92 ± 0,73	11,12 ± 0,80	11,28 ± 0,56	11,20 ± 0,56
Печеночные ферменты								
Активность аланинаминотрансферазы (МЕ л ⁻¹)	24,00 ± 14,82	23,20 ± 15,71	27,40 ± 27,32	24,40 ± 13,85	27,40 ± 27,32	24,40 ± 13,85	29,20 ± 13,72	27,80 ± 12,05
Активность аспаргатаминотрансферазы (МЕ л ⁻¹)	17,00 ± 6,33	16,60 ± 6,35	19,33 ± 9,48	17,67 ± 5,05	19,33 ± 9,48	17,67 ± 5,05	23,00 ± 9,14	19,80 ± 7,98
Активность γ-глутамилтрансферазы (МЕ л ⁻¹)	22,40 ± 15,76	23,60 ± 18,05	40,40 ± 38,44	33,40 ± 24,42	40,40 ± 38,44	33,40 ± 24,42	45,20 ± 28,90	42,80 ± 24,94
Функция почек								
Мочевина (мг дл ⁻¹)	35,20 ± 10,26	30,00 ± 7,25	28,60 ± 9,42	30,40 ± 4,98	28,60 ± 9,42	30,40 ± 4,98	31,40 ± 2,88	43,40 ± 18,96
Креатинин (мг дл ⁻¹)	0,73 ± 0,11	0,71 ± 0,10	0,78 ± 0,09	0,80 ± 0,15	0,78 ± 0,09	0,80 ± 0,15	0,83 ± 0,18	0,89 ± 0,21
Скорость клубочковой фильтрации (мл мин ⁻¹ 1,73 м ²)	92,20 ± 22,52	95,20 ± 17,11	88,60 ± 10,06	88,60 ± 20,19	88,60 ± 10,06	88,60 ± 20,19	83,80 ± 14,17	78,00 ± 15,41
Мышечные ферменты								
Активность креатининкиназы (МЕ л ⁻¹)	78,80 ± 25,37	79,40 ± 28,06	92,40 ± 40,32	94,80 ± 38,11	92,40 ± 40,32	94,80 ± 38,11	162,40 ± 122,30	135,50 ± 87,53
Активность лактатдегидрогеназы (МЕ л ⁻¹)	176,60 ± 19,86	167,20 ± 22,86	172,60 ± 20,74	176,20 ± 33,22	172,60 ± 20,74	176,20 ± 33,22	180,60 ± 17,70	171,40 ± 34,44

Кроме того, во всех группах зарегистрирована одинаковая частота побочных эффектов (табл. 5).

Таблица 5. Доля пациентов, ощущавших неблагоприятные эффекты, о которых они сообщали сами (n=5)

	Плацебо	Акк S - 10 ¹⁰	Акк S - 10 ⁹	Акк P - 10 ⁹
Тошнота	1/5	0	2/5	1/5
Метеоризм	0	1/5	3/5	1/5
Вздутие	1/5	1/5	0	0
Спазмы	1/5	1/5	0	1/5
Урчание в животе	0	3/5	3/5	0
Отрыжка желудочным соком	1/5	0	1/5	0

Некоторые пациенты, которых лечили живыми *Akkermansia muciniphila*, сообщали об урчании в животе, но отличие от других групп являлось незначительным.

Хотя число субъектов является ограниченным, эти первые данные о человеке предполагают, что как живые, так и пастеризованные *Akkermansia muciniphila* хорошо переносятся добровольцами с ожирением/избыточным весом и выглядят безопасными для перорального применения.

Кроме того, в конце периода лечения у пациентов, получавших высокую дозу живых и/или пастеризованных *Akkermansia muciniphila*, наблюдались перспективные тенденции в отношении жировой массы, гликемии и маркеров воспаления.

Перечень последовательностей

<110> УНИВЕРСИТЕ КАТОЛИК ДЕ ЛУВЕН [BE]
ВАГЕНИНГЕН УНИВЕРСИТЕТ [NL]

<120> Применение Akkermansia muciniphila для лечения метаболических расстройств, увеличения расхода энергии и насыщения, снижения веса, композиция, фармацевтическая композиция, косметическая композиция, лекарственное средство.

<130> EA201800199

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<223> Праймер RPL-19 Прямой

<400> 1

gaaggtcaaa gggaatgtgt tca 23

<210> 2

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<223> Праймер RPL-19 Обратный

<400> 2

cctgtctgc cttcagcttg t 21

<210> 3

<211> 19

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<223> Праймер Osln Прямой

<400> 3

atgtccggcc gatgctctc 19

<210> 4

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <223> Праймер Ocin Обратный
 <400> 4
 ttggctgct cttgggtctg tat 23

<210> 5
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <223> Праймер Cldn3 Прямой
 <400> 5
 tcacggcag cagcatcatc ac 22

<210> 6
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <223> Праймер Cldn3 Прямой
 <400> 6
 acgatggtga tctggcctt gg 22

<210> 7
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <223> Праймер Lyz1 Прямой
 <400> 7
 gccaaagtct acaatcgttg tgagttg 27

<210> 8
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <223> Праймер Lyz1 Обратный
 <400> 8
 cagtcagcca gcttgacacc acg 23

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* для лечения нарушения обмена веществ, при этом нарушение обмена веществ выбрано из группы, включающей ожирение; метаболический синдром; нарушения, связанные с дефицитом инсулина или инсулинорезистентностью; сахарный диабет, включая диабет 2 типа; непереносимость глюкозы; аномальный липидный обмен; гипергликемию; дислипидемию; дисфункцию иммунной системы, связанную с избыточным весом и ожирением; заболевания, связанные с нарушением барьерной функции, включая воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона и язвенный колит, синдром раздраженной толстой кишки; высокий уровень холестерина; атерогенную дислипидемию.

2. Применение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* для лечения нарушения обмена веществ по п.1, при этом нарушением обмена веществ является ожирение.

3. Применение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* для увеличения расхода энергии субъектом.

4. Применение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* для усиления ощущения сытости у субъекта.

5. Способ лечения нарушения обмена веществ у нуждающегося в этом субъекта, при этом нарушение обмена веществ выбрано из группы, включающей ожирение; метаболический синдром; нарушения, связанные с дефицитом инсулина или инсулинорезистентностью; сахарный диабет, включая диабет 2 типа; непереносимость глюкозы; аномальный липидный обмен; гипергликемию; дислипидемию; дисфункцию иммунной системы, связанную с избыточным весом и ожирением; заболевания, связанные с нарушением барьерной функции, включая воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона и язвенный колит, синдром раздраженной толстой кишки; высокий уровень холестерина; атерогенную дислипидемию, предусматривающий введение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* субъекту.

6. Способ увеличения расхода энергии субъектом, предусматривающий введение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* субъекту.

7. Способ усиления ощущения сытости у субъекта, предусматривающий введение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* субъекту.

8. Способ по пп.5-7, где *Akkermansia muciniphila* принимают перорально.

9. Способ по пп.5-8, где количество *Akkermansia muciniphila* составляет от около 1×10^4 до около

1×10^{12} КОЕ, более предпочтительно от около 1×10^5 до около 1×10^{11} КОЕ, и еще более предпочтительно от около 1×10^6 до около 1×10^{10} КОЕ.

10. Способ по любому из пп.5-9, при этом вводят пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila* по меньшей мере три раза в неделю.

11. Способ по любому из пп.5-10, где вводят пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila* совместно с другим пробиотическим штаммом и/или с одним или несколькими пребиотиками.

12. Композиция для увеличения расхода энергии субъектом, содержащая пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila* в сочетании с эксципиентом.

13. Композиция для усиления ощущения сытости у субъекта, содержащая пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila* в сочетании с эксципиентом.

14. Композиция по п.12 или 13, которая является пищевой композицией.

15. Фармацевтическая композиция для лечения нарушения обмена веществ, при этом нарушение обмена веществ выбрано из группы, включающей ожирение; метаболический синдром; нарушения, связанные с дефицитом инсулина или инсулинорезистентностью; сахарный диабет, включая диабет 2 типа; непереносимость глюкозы; аномальный липидный обмен; гипергликемию; дислипидемию; дисфункцию иммунной системы, связанную с избыточным весом и ожирением; заболевания, связанные с нарушением барьерной функции, включая воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона и язвенный колит, синдром раздраженной толстой кишки; высокий уровень холестерина; атерогенную дислипидемию, содержащая пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila* в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

16. Фармацевтическая композиция для увеличения расхода энергии субъектом, содержащая пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila* в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

17. Фармацевтическая композиция для усиления ощущения сытости у субъекта, содержащая пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila* в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

18. Применение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* для стимулирования потери веса у нуждающегося в этом субъекта.

19. Композиция, содержащая пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila*, для стимулирования потери веса у нуждающегося в этом субъекта.

20. Пищевая композиция, содержащая пастеризованную культуру *Akkermansia muciniphila*, для стимулирования потери веса у нуждающегося в этом субъекта.

21. Пищевая композиция по п.20, где композиция представляет пищевую добавку, напиток, диетическую добавку, пищевой продукт, лечебное питание или нутрицевтик.

22. Применение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* для восстановления эпителиального барьера.

23. Применение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* для восстановления барьерной функции пищеварительного тракта.

24. Применение по п.22 или 23, где *Akkermansia muciniphila* находится в составе пищевой добавки, напитка, диетической добавки, пищевого продукта, лечебного питания или нутрицевтика.

25. Способ стимулирования потери веса у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* субъекту.

26. Способ восстановления эпителиального барьера, предусматривающий введение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* субъекту.

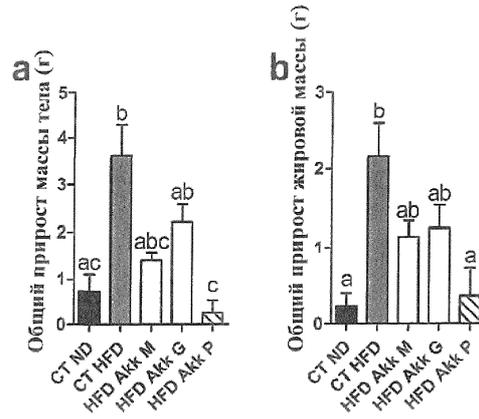
27. Способ восстановления барьерной функции пищеварительного тракта, предусматривающий введение пастеризованной культуры *Akkermansia muciniphila* субъекту.

28. Способ по пп.25-27, где *Akkermansia muciniphila* вводят перорально.

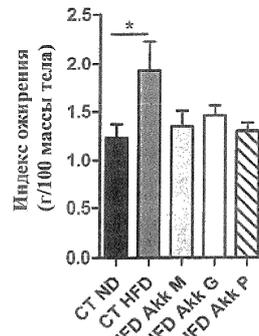
29. Способ по пп.25-28, где количество *Akkermansia muciniphila* составляет от около 1×10^4 КОЕ до около 1×10^{12} КОЕ, более предпочтительно от около 1×10^5 до около 1×10^{11} , и еще более предпочтительно от около 1×10^6 до около 1×10^{10} КОЕ.

30. Способ по пп.25-29, где *Akkermansia muciniphila* вводят три раза в неделю.

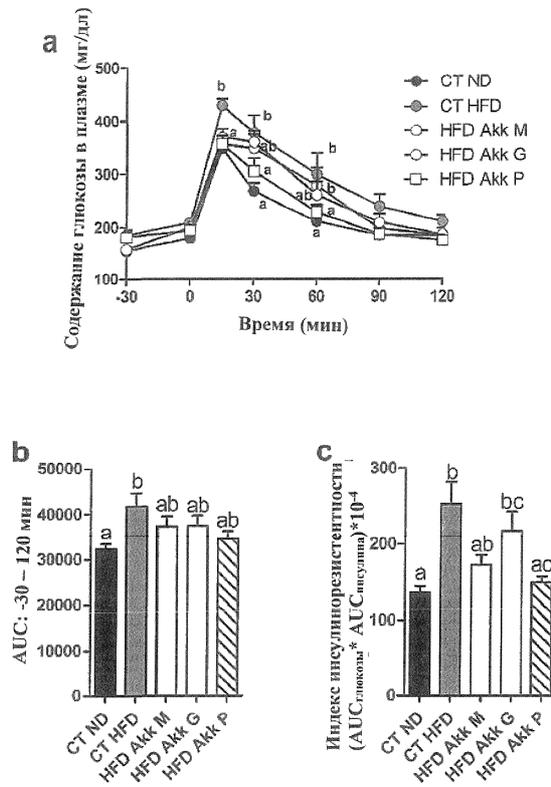
31. Способ по пп.25-30, где *Akkermansia muciniphila* вводят с другим пробиотическим штаммом и/или одним или несколькими пребиотиками.



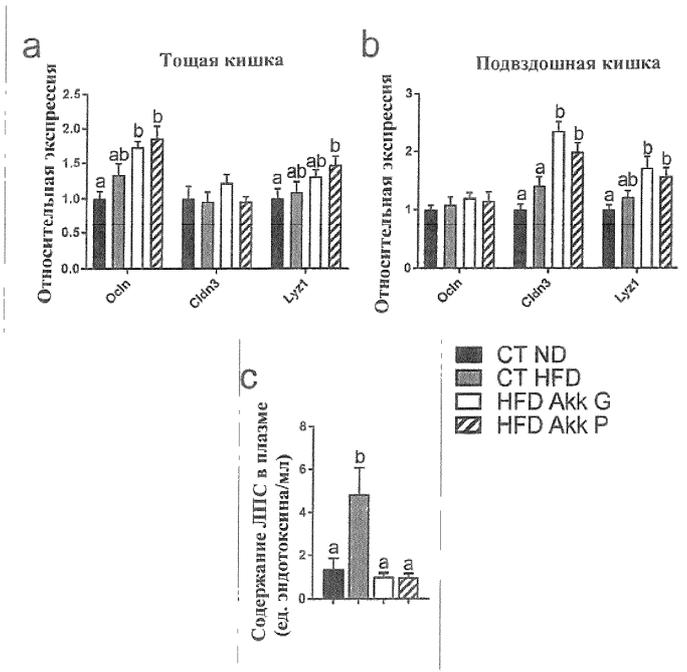
Фиг. 1



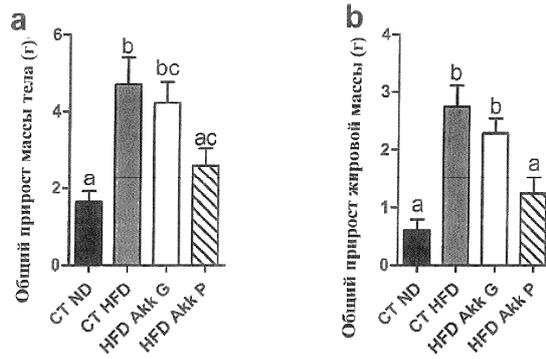
Фиг. 2



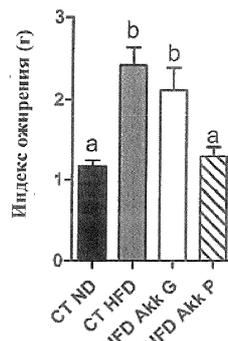
Фиг. 3



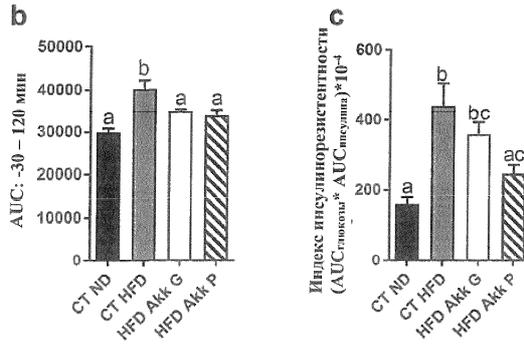
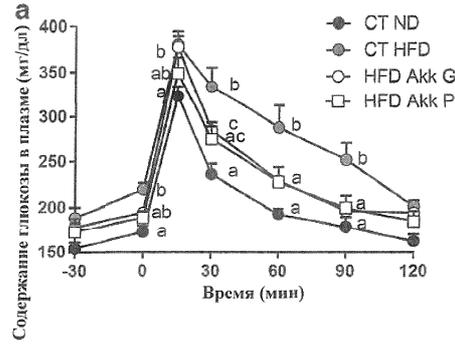
Фиг. 4



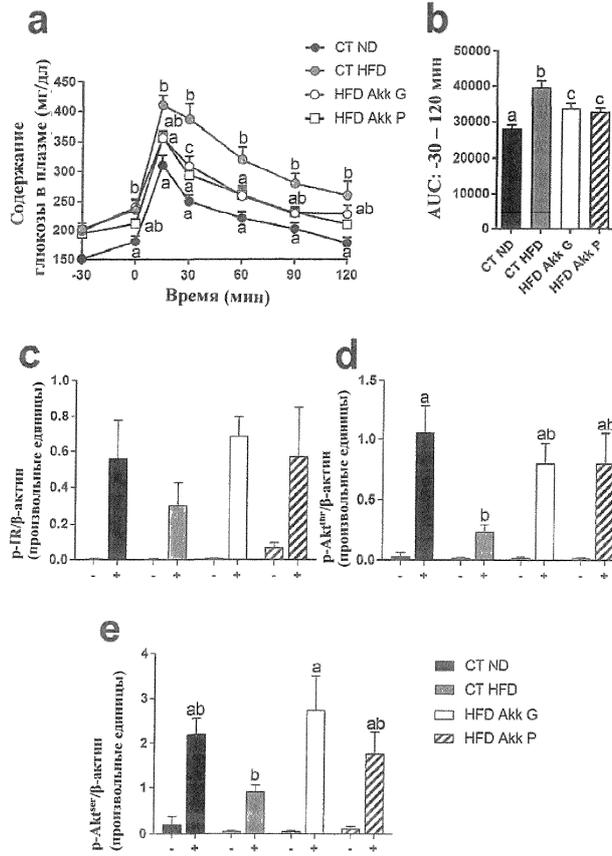
Фиг. 5



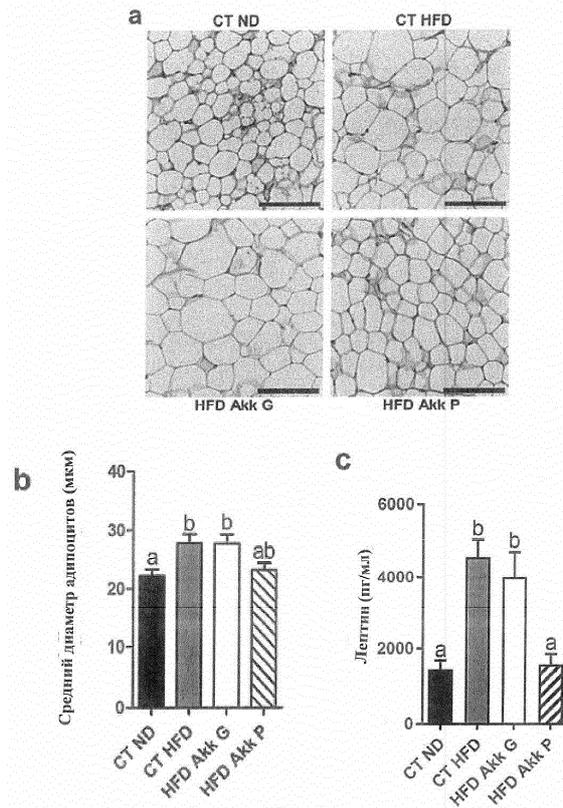
Фиг. 6



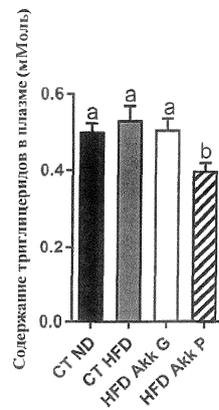
Фиг. 7



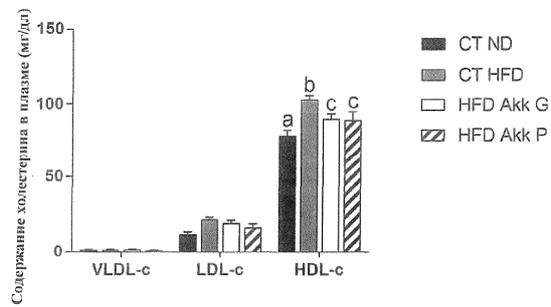
Фиг. 8



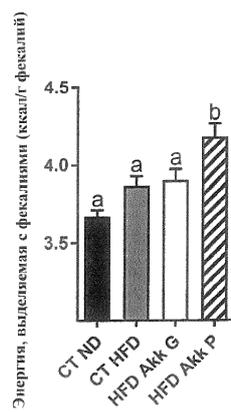
Фиг. 9



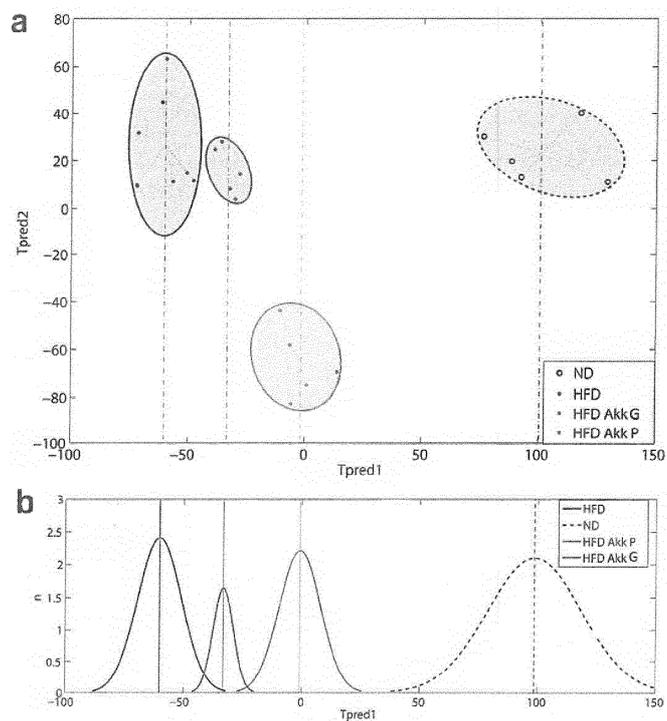
Фиг. 10



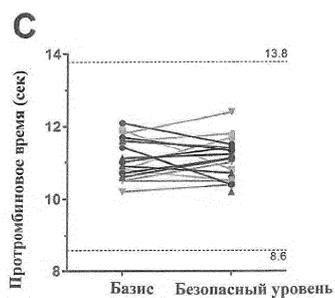
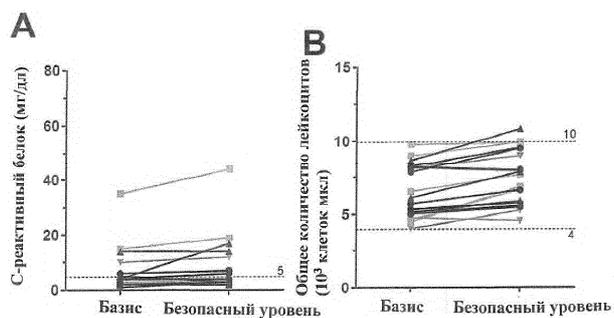
Фиг. 11



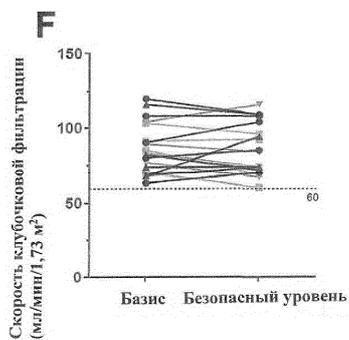
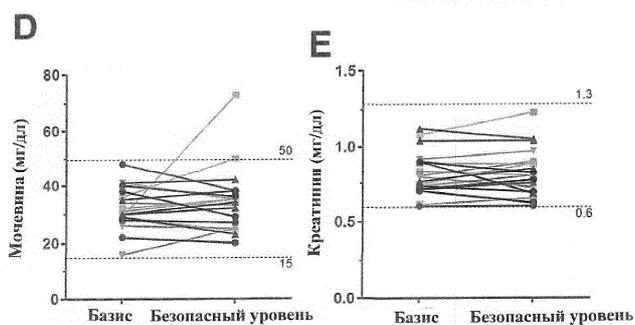
Фиг. 12



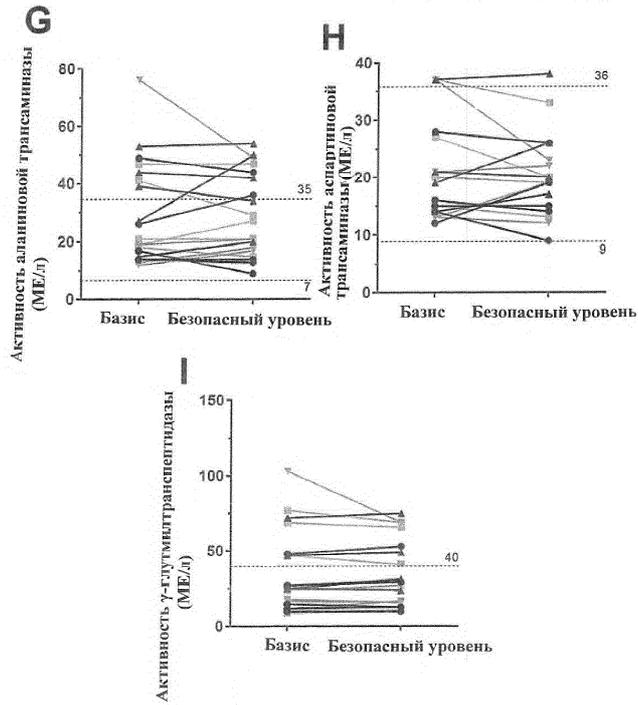
Фиг. 13



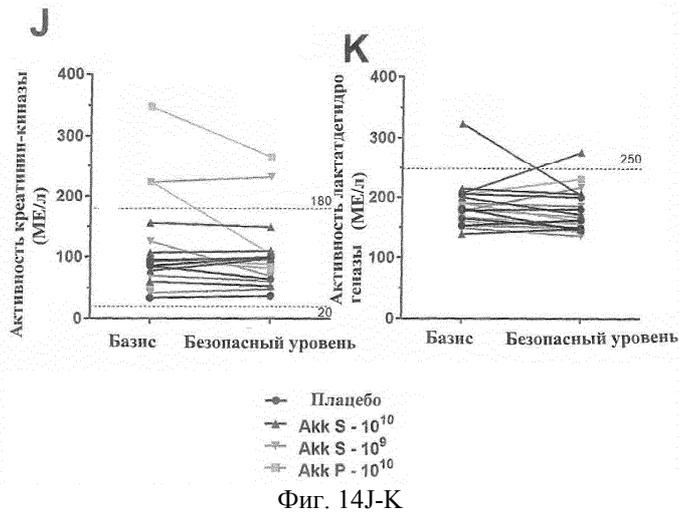
Фиг. 14А-С



Фиг. 14D-F



Фиг. 14G-I



Фиг. 14J-K

