

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044429**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.25

(21) Номер заявки
201800564

(22) Дата подачи заявки
2017.04.11

(51) Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) ШТАММ АККЕРМАНСИЯ GLYCANIPHILUS, КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ШТАММ, ПРИМЕНЕНИЕ ШТАММА И КОМПОЗИЦИИ, СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ШТАММА АККЕРМАНСИЯ GLYCANIPHILUS В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

(31) **16164743.3**

(32) **2016.04.11**

(33) **EP**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/EP2017/058700**

(87) **WO 2017/178496 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАГЕНИНГЕН УНИВЕРСИТЕТ (NL)

(72) Изобретатель:
**Де Вос Виллем Мейндерт, Белзер
Клара (NL)**

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

(56) OUWERKERK JANNEKE P. ET AL. "Akkermansia glycaniphila sp. nov., an anaerobic mucin-degrading bacterium isolated from reticulated python faeces.", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY NOV 2016, vol. 66, no. 11, November 2016 (2016-11), pages 4614-4620, XP002769813, ISSN: 1466-5034, the whole document WO-A1-2014076246

M. DERRIEN ET AL. "Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 54, no. 5, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 1469-1476, XP055074486, ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ijs.0.02873-0, the whole document

ELIZABETH K. COSTELLO ET AL. "Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons", THE I S M E JOURNAL: MULTIDISCIPLINARY JOURNAL OF MICROBIAL ECOLOGY, vol. 4, no. 11, 3 June 2010 (2010-06-03), pages 1375-1385, XP055303362, United Kingdom ISSN: 1751-7362, DOI: 10.1038/ismej.2010.71, abstract

CLARA BELZER ET AL. "Microbes inside-from diversity to function: the case of Akkermansia", THE ISME JOURNAL, vol. 6, no. 8, 22 March 2012 (2012-03-22), pages 1449-1458, XP055074477, ISSN: 1751-7362, DOI: 10.1038/ismej.2012.6 page 1453, right-hand column, paragraph 2 - page 1454, left-hand column, paragraph 1

(57) Из свежих фекалий сетчатого питона выделен новый вид рода Akkermansia. Это вид назван Akkermansia glycaniphilus. Он способен расти, используя слизь в качестве единственного источника углерода и азота. Вид может быть использован в качестве лекарства, пробиотика или косметического средства, например, для содействия снижению массы тела, для стимуляции иммунной системы кишечника, для поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности мукозального барьера кишечника и для профилактики или лечения разнообразных ассоциированных заболеваний или нарушений.

B1**044429****044429****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к профилактике и/или лечению метаболических нарушений, таких как метаболические нарушения, связанные с избыточной массой тела и ожирением, например сахарный диабет 2 типа и высокий уровень холестерина. Изобретение относится также к способу модулирования и/или стимуляции функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника и/или поддержанию, и/или восстановлению, и/или повышению физической целостности мукозального барьера кишечника у млекопитающего, например у человека или домашнего либо сельскохозяйственного животного.

Предшествующий уровень техники

Ожирение является, главным образом, последствием вредных пищевых и физических привычек, развивающимся на неблагоприятном генетическом фоне. Оно имеет серьезные последствия для здоровья, включая повышенный риск сахарного диабета 2 типа, сердечно-сосудистую патологию, легочную гипертензию, синдром апноэ во сне и несколько типов рака и тесно взаимосвязано с повышенным риском смерти.

Для кишечного тракта человека характерно широкое разнообразие микроорганизмов, среди которых наиболее многочисленными и разнообразными являются бактерии. В целом, микробном более чем 100-кратно превышает геном человека. Таким образом, кишечную микробиоту можно рассматривать как "внешний" орган, который участвует в общем метаболизме и играет важную роль в превращении пищи в питательные вещества и энергию. В сообществе, насчитывающем не менее 10^{14} бактерий, преобладают анаэробные бактерии, и оно состоит из нескольких тысяч видов, из которых 1000 в настоящее время выращиваются в культуре (Rajilic Stojanovic and de Vos, 2014, FEMS Microbiol Rev 38: 996-1047).

Появляется все больше фактов, демонстрирующих роль кишечной микробиоты в метаболизме организма хозяина. В настоящее время полагают, что гомеостаз бактерий кишечника зависит от характеристик хозяина (возраста, пола, генетического фона и т.д.), условий окружающей среды (стресса, применения лекарственных средств, хирургических вмешательств на желудочно-кишечном тракте и т.д.) и также от диеты.

На фоне лечения пробиотиками у мышей с алиментарным ожирением и диабетом наблюдалось улучшение метаболизма глюкозы и липидов, снижение концентрации липополисахаридов в плазме и улучшение барьерной функции кишечника (например, уменьшение воспаления), повышение численности аргентаффинных L-клеток и улучшение чувствительности к лептину и гомеостаза глюкозы (Everard et al., Diabetes, 2011, vol. 60(11):2775-86). Лечение пробиотиками существенно изменяло состав кишечной микробиоты у этих мышей, в том числе существенно повышало численность *Akkermansia muciniphila*.

Обнаружено, что пероральное введение *A. muciniphila* мышам, которым скармливали контрольный рацион или рацион с высоким содержанием жиров (ВСЖ), приводило к нормализации алиментарной метаболической эндотоксемии, жировых отложений и маркера жировой ткани D11c без каких-либо изменений в потреблении корма (WO2014/075745). Более того, лечение *A. muciniphila* приводило к снижению массы тела и улучшению состава тела (т.е. соотношения жировой/мышечной массы). Обнаружено, что в условиях рациона ВСЖ лечение *A. muciniphila*, не оказывая влияния на липогенез, повышало уровень экспрессии мРНК маркеров дифференцировки адипоцитов и окисления липидов. Обнаружено также, что колонизация кишечника *A. muciniphila* полностью устраняла алиментарную гипергликемию в крови натощак, и после лечения аналогичным образом снижался индекс резистентности к инсулину. Наконец, выяснилось, что *A. muciniphila* усиливает барьерную функцию кишечника (J. Reunanen et al. 2015, Appl Environ Microbiol. 81:3655-62.). Именно кишечный барьер защищает нас от патогенов и вредных компонентов содержимого кишечника, тогда как сниженная функция кишечника сопровождается различными нарушениями и заболеваниями, включая СРК, ВЗК и другими нарушениями, связанными со здоровьем кишки. Недавно было определено, что кишечный барьер является функциональной структурой, отделяющей просвет кишечника от внутренних органов хозяина и состоящей из механических, гуморальных, иммунологических, мышечных и неврологических элементов (SC Bishoff et al., 2014, BMC Gastroenterol. 14:189). Таким образом, улучшение проницаемости кишечника, которую можно определить, как измеряемую характеристику кишечного барьера, является важным фактором, влияющим на здоровье кишечника.

Для того чтобы пробиотическая бактерия приносила пользу в кишечном тракте, она должна быть активной в соответствующем месте кишечного тракта. Кишечный тракт человека и других животных имеет сложную архитектуру, для которой, в частности, характерны очень большие различия в величине pH. В просвете кишечного тракта человека в двенадцатиперстной кишке, которая находится после кишечника с кислой средой, кислотность составляет приблизительно pH 6, повышается в тонком кишечнике от pH 6 до pH 7,4 в терминальном отделе подвздошной кишки, падает до pH 5,7 в слепой кишке и постепенно повышается, достигая pH 6,7 в прямой кишке. У некоторых животных значения pH характеризуются высокой изменчивостью, и у собак pH обычно выше, чем у человека и достигает pH 7,3, тогда как у кошек, в зависимости от породы, pH кишечника может быть ниже 6,6. pH кишечника может меняться в зависимости от рациона питания, возраста и наличия заболеваний. pH представляет собой десятичный логарифм концентрации протонов, поэтому изменение pH на одну единицу отражает 10-кратное различие в концентрации протонов. Поэтому было бы интересно иметь пробиотики, активные при разных зна-

чениях рН, для применения как у человека, так и у домашних и сельскохозяйственных животных.

Цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить инновационный пробиотик, который может применяться для профилактики и/или лечения метаболических нарушений и/или улучшения барьерной функции кишечника.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенному штамму *Akkermansia glycaniphilus*, который предпочтительно способен к росту на муцине, как на единственном источнике углерода и азота, и который предпочтительно дополнительно способен к росту на N-ацетилглюкозамине, N-ацетилгалактозамине, глюкозе, лактозе, мальтозе или галактозе в качестве единственного источника углерода. В одном варианте осуществления изобретения данный штамм представляет собой штамм, который зарегистрирован и хранится в депозитории штаммов института Centraalbureau voor Schimmelcultures, как CBS141023, или производный от него штамм.

В изобретении также предлагается композиция, содержащая выделенный штамм *Akkermansia glycaniphilus* и физиологически приемлемый носитель. Такая композиция может быть фармацевтической композицией, предпочтительно, представленная твердой лекарственной формой, такой как капсула, таблетка или порошок. В одном варианте осуществления изобретения указанный штамм *Akkermansia glycaniphilus* присутствует в лиофилизированной или микроинкапсулированной форме. Указанный штамм *Akkermansia glycaniphilus* может присутствовать в количестве от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{15} клеток. Изобретение дополнительно относится к выделенному штамму *Akkermansia glycaniphilus* или композиции, предназначенным для использования в качестве лекарственного средства, пробиотика и/или симбиотика или для использования в качестве косметического средства. Штамм или композиция могут, например, использоваться для стимуляции функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника, для поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности мукозального барьера кишечника у млекопитающего, для содействия снижению массы тела и/или для профилактики и/или лечения нарушения, выбранного из группы, включающей метаболический синдром, ожирение, недостаточность инсулина или нарушения, связанные с резистентностью к инсулину, сахарный диабет 2 типа, сахарный диабет 1 типа, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), нарушение толерантности к глюкозе, аномальный метаболизм липидов, атеросклероз, гипертензию, патология сердца, инсульт, неалкогольный жировой гепатоз, алкогольный жировой гепатоз, гипергликемию, жировой гепатоз, дислипидемии, сопровождающуюся ожирением (увеличением массы тела) дисфункцию иммунной системы, аллергию, астму, аутизм, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессию, другие заболевания, связанные со сниженной барьерной функцией кишечника, (нарушение) заживление ран, нарушения поведения, алкогольную зависимость, сердечнососудистые заболевания, высокое содержание холестерина, повышенное содержание триглицеридов, атеросклероз, апноэ во сне, остеоартрит, заболевание желчного пузыря, рак и состояния, изменяющие физическую целостность мукозального барьера кишечника, такие как пищевые аллергии, незрелость кишечника, например, вследствие недоношенности, воздействия ионизирующей радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность питания и сепсис.

В настоящем изобретении также предложен способ повышения уровня *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном (ЖК) тракте млекопитающего, предпочтительно, человека, включающий стадии: введения выделенного штамма *Akkermansia glycaniphilus* или композиции согласно настоящему изобретению указанному млекопитающему; и стимуляции роста указанного штамма *Akkermansia glycaniphilus* в ЖК тракте млекопитающего путем введения соединения, которое выбирают из группы, включающей соединения, содержащие в качестве структурных звеньев глюкозамин или производные глюкозамина, такие как N-ацетилглюкозамин, и полифенолы.

Определения

Термин "пробиотический" или "пробиотические продукты", используемые в настоящей заявке, относятся к микроорганизмам, таким как кишечные бактерии, которые при введении или проглатывании в эффективных количествах приносят пользу хозяину (т.е. людям или млекопитающим). Предпочтительно, чтобы пробиотики были живыми или жизнеспособными при введении их субъекту, для того чтобы они смогли колонизировать толстый кишечник хозяина. Однако в определенных условиях пробиотики могут быть также мертвыми при введении при условии, что образованные пробиотиками вещества по-прежнему оказывают благотворное пробиотическое воздействие на хозяина. Большинство пробиотиков или пробиотических продуктов состоят из молочнокислых бактерий, таких как лактобациллы или бифидобактерии. Специалисту, хорошо ориентирующемуся в области пробиотиков, известно, как выбирать молочнокислые бактерии, обладающие пробиотической активностью.

Вид *Akkermansia glycaniphilus* согласно изобретению является тем же самым видом, который имеет название *Akkermansia glycaniphila*, например, в публикации Ouwkerk et al. (2016. Int J of Syst Evol Microbiol 66:1-7). Таким образом, эти названия являются взаимозаменяемыми (синонимами).

Термин "пребиотический" или "пребиотические продукты", используемые в настоящей заявке, относятся к соединениям, которые стимулируют рост и/или активность микроорганизмов, населяющих ЖК тракт и способствующих благополучию организма хозяина. Пребиотики или пребиотические продукты

состоят, главным образом, из сбраживаемой клетчатки или неусваиваемых углеводов. Сбраживание этой клетчатки пробиотиками способствует образованию полезных конечных продуктов, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), в частности бутираты. Специалисту, хорошо ориентирующемуся в области пробиотиков, известно, как выбирать ингредиенты, обладающие пребиотической активностью.

Термин "симбиотический" или "симбиотические продукты", используемые в настоящей заявке, в целом, относятся к композициям и/или пищевым добавкам, в которых в одном продукте объединены пробиотики и одно или несколько соединений, способствующих росту и/или активности ЖК микроорганизмов, например, пребиотики. Симбиотик оказывает благоприятное влияние на организм хозяина, улучшая выживаемость и колонизацию пробиотика в ЖКТ, выборочно стимулируя рост и/или активируя метаболизм пробиотика, и, тем самым, улучшая здоровье хозяина. Специалисту, хорошо ориентирующемуся в области пробиотиков, известно, как выбирать ингредиенты, которые могут быть объединены в составе симбиотика.

Термин "полезные виды кишечных бактерий" относится к виду бактерий, который населяет (т.е. является естественным) кишечник млекопитающего (например, человека) и оказывает благоприятное воздействие (например, осуществляет защиту от патогенных видов бактерий, образование масляной кислоты и/или бутирата и их производных, и т.д.) на желудочно-кишечные, метаболические и другие аспекты здоровья млекопитающего, в котором он обитает. Не имеющие ограничительного характера примеры полезных видов кишечных бактерий включают молочнокислые бактерии, принадлежащие к родам *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Другие, не имеющие ограничительного характера примеры полезных видов кишечных бактерий включают бутиратобразующие виды бактерий, которые используют ацетил-КоА для образования масляной кислоты и/или бутирата и их производных, такие, как бактериальные штаммы, предложенных в патентах US2014/0242654, WO 2014/150094 или WO2013032328 A1. Аналогично, пропионатобразующие виды могут рассматриваться, как пробиотики, потому что пропионат, например, бутират, контролирует массу тела и чувствительность к инсулину, передает сигналы иммунной системе, используя для этого, помимо прочего, регуляторные Т-лимфоциты, и оказывает влияние на нейронные цепи через рецептор FFAR2 (Canfora et al., 2015. *Nature Reviews Endocrinology* 11:577-591; Smith et al., 2013. *Science* 341:569-573; Erny et al., 2015, *Nat Neurosci* 18:965-977). Пропионат является субстратом для глюконеогенеза в печени, подавляет синтез липидов и холестерина и оказывает защитное воздействие при воспалении и канцерогенезе (Hosseini et al., 2011. *Nutrition Reviews* 69:245-258). Применение диеты у человека показало, что пропионат также усиливает чувство сытости и регулирует аппетит, что приводит к поддержанию массы тела у взрослых с избыточной массой тела (Chambers et al 2015. *Gut* 64:1744-1754).

Термин "патогенные виды бактерий" относится к бактерии, которая населяет (т.е. является естественной) кишечник млекопитающего (например, человека) и оказывает вредное воздействие (например, вызывает инфекцию) на здоровье ЖКТ млекопитающего, в котором она обитает. Не имеющим ограничительного характера примером пользующегося дурной славой патогенного вида бактерий является токсинобразующая бактерия *Clostridium difficile*.

Термин "эффективное количество" относится к количеству, необходимому для достижения эффекта, указанного в настоящем документе. Специалист обычной квалификации может легко определить эффективное количество, не выполняя излишних экспериментов.

Термин "производный от него штамм" относится к штаммам, полученным в результате использования депонированного штамма, как исходного материала. Производный от него штамм может быть мутантным штаммом, который может быть получен из штамма согласно изобретению посредством, использования, например, геной инженерии, ионизирующей радиации, УФ-излучения, химической обработки. Альтернативно, такой производным или мутантным штаммом может быть штамм, производный от хранящегося в депозитории штамма, описанного в настоящей заявке, адаптированный к росту в определенных условиях, которые обеспечили дополнительные преимущества производному штамму, такие как более быстрый рост, улучшенная выживаемость в кишечнике и т.д., предпочтительно, чтобы производный или мутантный штамм был эквивалентен депонированному штамму согласно изобретению. Предпочтительный производный или мутантный штамм обладает, по существу, такой же активностью или функцией, как депонированный штамм. Производный или мутантный штамм эффективно обеспечивает млекопитающему (например, человеку или другим животным), которому вводят указанный производный или мутантный штамм, такие же преимущества, которые обеспечивало бы введение депонированного штамма. Производный или мутантный штамм может также быть спонтанно производным или мутировавшим штаммом, обладающим такими же характеристиками, которые описаны в настоящей заявке для депонированного штамма.

Термин "пригодный для употребления внутрь" или "питательно приемлемый" относится к ингредиентам или веществам, общепризнанно безопасными для употребления человеком (и другими млекопитающими).

Термины "содержащий" или "содержать" означает, что содержащиеся элементы не ограничиваются перечисленными после указанных терминов.

Термины "увеличивать (повышать)" и "увеличенный (повышенный) уровень" и термины "снижать" и "сниженный уровень" относятся к способности значимо увеличивать или значимо снижать либо к зна-

чимо увеличенному уровню или значимо сниженному уровню. Как правило, уровень является увеличенным или сниженным, если он, по меньшей мере, на 5%, например, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% выше или ниже, соответственно, чем соответствующий уровень в контроле или варианте сравнения. Уровень в образце может быть повышенным или сниженным, если он является статистически значимо повышенным или сниженным по сравнению с уровнем в контроле или сравнительном варианте.

Подробное описание изобретения

Бактерии.

Выделен новый вид рода *Akkermansia*, штамм Pyt^T, из кишечника сетчатого питона.

Это грамотрицательная, неподвижная, строго анаэробная, неспорообразующая бактерия, имеющая овальную форму. Эта бактерия способна использовать муцин в качестве единственного источника углерода, энергии и азота, таким же свойством обладает присутствующий у человека штамм *Akkermansia muciniphila* Muc^T. Штамм Pyt^T может расти на ограниченном количестве моносахаров, включая N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, лактозу, мальтозу и галактозу, но лишь при обеспечении в избыточном количестве источника белка.

Филогенетический анализ, основанный на секвенировании гена 16S рНК, показал, что штамм Pyt^T принадлежит к классу I Verrucomicrobiae, семейству Akkermansiaceae, роду *Akkermansia*, и его ближайшим родственным видом является вид *Akkermansia muciniphila* Muc^T (сходство последовательностей составляет 94.4%). Основываясь на фенотипических, филогенетических и генетических характеристиках, штамм Pyt^T представляет собой новый вид рода *Akkermansia*, для которого предложено название *Akkermansia glycaniphilus* sp. nov., и типовым штаммом является Pyt^T.

Таким образом, изобретение относится к штамму вида *Akkermansia glycaniphilus*, например, типовому штамму Pyt^T, который хранится в депозитории штаммов Вагенингенского университета, Нидерланды, где 24 февраля 2016 г. ему был присвоен номер CBS141023; или к производному от него штамму.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный штамм способен к росту на муцине, являющемся единственным источником углерода и азота. Гликаны муцина состоят, в основном, из галактозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, и штамм *A. glycaniphilus* Pyt^T способен использовать все эти соединения в качестве питательного субстрата. В отличие от штамма *A. muciniphila* Muc^T, штамм *A. glycaniphilus* Pyt^T способен использовать галактозу в качестве единственного источника углерода, образуя, в основном, пропионат, ацетат и в небольшом количестве сукцинат.

Хотя для штамма *A. glycaniphilus* strain Pyt^T возможен оптимальный рост в широком диапазоне pH, оптимальный pH для роста этого штамма приблизительно на 0,5 единиц pH ниже, чем для *A. muciniphila* Muc^T.

Показано, что в кишечнике субъектов с ожирением или избыточной массой тела уровень *Akkermansia muciniphila* резко снижен, и что введение в рацион *Akkermansia muciniphila* приводило к нормализации алиментарной метаболической эндотоксемии, жировых отложений и маркера жировой ткани D11c без каких-либо изменений в потреблении корма (WO2014/075745). Более того, лечение *A. muciniphila* приводило к снижению массы тела и улучшению состава тела (т.е. соотношения жировой/мышечной массы). При рассмотрении сходства с видом *Akkermansia muciniphila* предполагается, что *Akkermansia glycaniphilus* способен предотвращать и/или лечить метаболические нарушения таким же образом, как и *Akkermansia muciniphila*. Аналогично, ожидается, что *Akkermansia glycaniphilus* будет усиливать барьерную функцию, которую стимулирует *Akkermansia muciniphila*, поскольку обнаружено, что *Akkermansia glycaniphilus* является единственным представителем *Akkermansia* spp. на стенке кишечника питона. Подобно *A. muciniphila*, содержание *Akkermansia* в кишечнике увеличивается при голодании, которое является частью нормального жизненного цикла питона (Belzer and de Vos, 2012, ISME J 6:1449-58).

В одном варианте осуществления изобретения, указанный штамм дополнительно способен к росту на N-ацетилглюкозамине, N-ацетилгалактозамине, глюкозе, лактозе, мальтозе или галактозе, являющихся единственным источником углерода, и частично способен к росту в основной питательной среде на N-ацетилглюкозамине, N-ацетилгалактозамине, D-глюкозе, D-лактозе или D-галактозе в присутствии подходящего источника азота, такого как триптон с необязательно добавленным треонином, например, в базальной среде на N-ацетилглюкозамине, N-ацетилгалактозамине, D-глюкозе, D-лактозе или D-галактозе в присутствии триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л. Триптон представляет собой протеолитический гидролизат казеина, и вместо него могут быть использованы другие источники белка, например, полученные из сои или гороха и других растительных белков.

Композиция

Настоящее изобретение относится также к композиции, содержащей выделенный штамм *Akkermansia glycaniphilus* и физиологически приемлемый носитель.

В одном варианте осуществления изобретения физиологические приемлемым носителем может быть любой носитель, который подходит для поддержания жизнеспособности описанного в настоящем документе штамма бактерии до употребления его субъектом (например, человеком и/или животным). Так, не имеющие ограничительного характера примеры приемлемых носителей, пригодные для этой цели, включают любой из хорошо известных физиологических или фармацевтических носителей, буферов и вспомогательных веществ. Понятно, что выбор подходящего физиологического или фармацевтическо-

го носителя будет зависеть от предполагаемого способа введения композиции, описанной в данном документе (например, перорально), и предполагаемой формы композиции (например, жидкий напиток, йогурт, порошок, капсулы и т.д.). Специалисту известно, как выбирать физиологический или фармацевтический носитель, который подходит для композиций, описанных в данном документе.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция может быть в форме пищевой композиции, кормовой композиции, композиции кормовой добавки, композиции пищевой добавки или фармацевтической композиции. Композиция предпочтительно пригодна для употребления млекопитающим, например, человеком, домашним или сельскохозяйственным животным.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция представляет собой пищевую композицию или композицию пищевой добавки. Пищевая композиция или композиция пищевой добавки может быть выбрана из группы, включающей жидкость, жидкий напиток (включая молочный напиток и полученный при брожении напиток), йогурт, сыр, гель, желатин, желатиновую капсулу, порошок, пасту, прессованную таблетку и гелевую капсулу. В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция представляет собой жидкость, предпочтительно жидкий напиток (например, молочный напиток). Пищевая композиция или композиция пищевой добавки может быть предпочтительно сброженным молочным продуктом, предпочтительно йогуртом или йогуртовым напитком.

В ещё одном варианте осуществления изобретения композиция может быть пробиотической композицией. Такая пробиотическая композиция может содержать любой выделенный бактериальный штамм согласно изобретению или производный от него штамм.

В ещё одном варианте осуществления изобретения композиция дополнительно включает один или несколько дополнительных полезных выделенных штаммов кишечных бактерий.

В ещё одном варианте осуществления изобретения композиция может быть симбиотической композицией. Могут быть добавлены один или несколько пребиотических ингредиентов в композицию, например, чтобы усилить эффекты (например, образование масляной кислоты и/или бутирата или их производного) штамма кишечной бактерии согласно изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения один или несколько пребиотических ингредиентов могут быть пребиотическими ингредиентами, которые подходят для усиления активности и/или стимуляции роста выделенной кишечной бактерии или производного от нее штамма согласно изобретению. В частности, примеры подходящих пребиотических ингредиентов включают клетчатку, целлобиозу, мальтозу, маннозу, салицин, трегалозу, амигдалин, арабинозу, мелибиозу, рамнозу и/или ксилозу.

В ещё одном варианте осуществления изобретения композиция может включать один или несколько ингредиентов, подходящих для поддержки выживания и/или жизнеспособности бактериального штамма или производного от него штамма, описанного в данном документе, во время хранения и/или во время воздействия желчи и/или во время прохождения через ЖКТ млекопитающего (например, человека). В частности, примеры таких ингредиентов включают кишечнорастворимую оболочку и агентов, обеспечивающих контролируемое высвобождение, позволяющих пройти через желудок. Специалисту известно, как выбирать подходящие ингредиенты для поддержания бактериального штамма жизнеспособным и функциональным, т.е. способным выполнять предполагаемую функцию(и).

В одном варианте осуществления изобретения композиции могут дополнительно содержать один или несколько ингредиентов, которые дополнительно повышают пищевую ценность и/или терапевтическую ценность описанных в данном документе композиций. Например, могут быть добавлены один или несколько ингредиентов (например, пищевые ингредиенты, лекарственные агенты для ветеринарного или медицинского применения и т.д.), которые выбирают из белков, аминокислот, ферментов, солей неорганических кислот, витаминов (например, тиамина гидрохлорид, рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, ниацин, инозит, холина хлорид, кальция пантотенат, биотин, фолиевая кислота, аскорбиновая кислота, витамин В12, п-аминобензойная кислота, витамина А ацетат, витамин К, витамин D, витамин Е и т.д.), сахара и комплексных углеводов (например, водорастворимые и водонерастворимые моносахариды, дисахариды и полисахариды), лекарственных соединений (например, антибиотики), антиоксидантов, ингредиентов, представляющих собой микроэлементы (например, соединения кобальта, меди, марганца, железа, цинка, олова, никеля, хрома, молибдена, йода, хлора, кремния, ванадия, селена, кальция, магния, натрия и калия и т.п.). Специалисту известны способы и ингредиенты, подходящие для повышения питательной и/или терапевтической ценности описанных в данном документе композиций.

Бактериальный штамм согласно изобретению может быть включен в композицию в лиофилизированной форме, микроинкапсулированной форме (рассмотренной, например, в публикации Solanki et al. *BioMed Res. Int.* 2013, Статья № 620719), или любой другой форме, сохраняющей активность и/или жизнеспособность бактериального штамма.

Композиция согласно изобретению может быть фармацевтической композицией. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для использования в форме добавки. Обычно в дополнение к бактериальному штамму, фармацевтическая композиция будет содержать фармацевтический носитель. Носителем предпочтительно является инертный носитель. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и (терапевтического) применения. Фармацевтическим носителем может быть любое совместимое, нетоксичное вещество, пригодное для доставки бактерий, принадлежащих к

описанному в данном документе штамму, в ЖКТ субъекта. Например, в качестве носителя могут быть использованы стерильная вода или инертные твердые вещества, обычно с добавлением фармацевтически приемлемого адьюванта, буферного агента, диспергирующего агента и т.п. Фармацевтическая композиция может быть в жидкой форме, например, в форме стабилизированной суспензии бактерий, принадлежащих к штамму согласно изобретению, или в твердой форме, например, порошкообразные или лиофилизированные бактерии, принадлежащие к штамму согласно изобретению. В случае, когда бактериальный штамм является лиофилизированным, может быть использован криопротектор, такой как лактоза, трегалоза или гликоген. Например, в случае перорального введения бактерии, принадлежащие к штамму согласно изобретению, могут быть назначены в виде твердых лекарственных форм, например, капсул, таблеток и порошков, содержащих лиофилизированные бактерии, или в виде жидких лекарственных форм, таких как эликсиры, сиропы и суспензии. Бактерии в лиофилизированной форме, могут быть заключены в капсулы, например, желатиновые капсулы, вместе с неактивными ингредиентами и порошкообразными носителями, например, глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, крахмалом, целлюлозой или производными целлюлозы, стеаратом магния, стеариновой кислотой, натрия сахаринатом, тальком, карбонатом магния и т.п.

В ещё одном варианте осуществления изобретения кишечная бактерия или производный от нее штамм, согласно изобретению, могут входить в состав композиции в эффективном количестве, например, от около 10^4 до около 10^{15} клеток или колониеобразующих единиц (КОЕ). Например, кишечные бактерии могут содержаться в композиции в количестве от около 10^6 или 10^7 клеток или КОЕ до около 10^{14} клеток или КОЕ, предпочтительно от около 10^8 клеток или КОЕ до около 10^{13} клеток или КОЕ, предпочтительно от около 10^9 клеток или КОЕ до около 10^{12} клеток или КОЕ, более предпочтительно от около 10^{10} клеток или КОЕ до около 10^{12} клеток или КОЕ.

Для получения композиций согласно изобретению могут быть использованы любые стандартные способы.

Способы и применение бактериальных штаммов и композиций.

Другой аспект настоящего изобретения касается бактериального штамма или композиции для использования в качестве лекарственного средства, пищевого продукта или пищевой добавки или для использования в качестве пробиотика и/или симбиотика.

Настоящее изобретение также относится к выделенному штамму *Akkermansia glycaniphilus* или композиции для использования в профилактике и/или лечении нарушения, выбранного из группы, включающей метаболический синдром, ожирение, недостаточность инсулина или нарушения, связанные с резистентностью к инсулину, сахарный диабет 2 типа, сахарный диабет 1 типа, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), синдром раздраженного кишечника (СРК), нарушение толерантности к глюкозе, аномальный метаболизм липидов, атеросклероз, гипертензию, патологию сердца, инсульт, неалкогольный жировой гепатоз, алкогольный жировой гепатоз, гипергликемию, жировой гепатоз, дислипидемии, сопровождающуюся ожирением (увеличением массы тела) дисфункцию иммунной системы, аллергию, астму, аутизм, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, нейродегенеративные заболевания, депрессию, другие заболевания, связанные со сниженной барьерной функцией кишечника, (нарушение) заживление ран, нарушения поведения, алкогольную зависимость, сердечнососудистые заболевания, высокое содержание холестерина, повышенное содержание триглицеридов, атеросклероз, апноэ во сне, остеоартрит, заболевание желчного пузыря, рак и состояния, изменяющие физическую целостность мукозального барьера кишечника, такие как пищевые аллергии, незрелость кишечника, например, вследствие недоношенности, воздействия ионизирующей радиации, химиотерапии и/или токсинов, аутоиммунные нарушения, недостаточность питания и сепсис, и использования для симуляции противовоспалительной активности в кишечнике млекопитающего.

В настоящем изобретении также предлагается способ модуляции и/или стимуляции функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника и/или поддержания, и/или восстановления, и/или повышения физической целостности мукозального барьера кишечника у млекопитающего, например, человека, указанный способ включает стадию введения штамма *Akkermansia glycaniphilus* или композиции нуждающемуся в ней млекопитающему, например человеку.

В одном из вариантов осуществления изобретения бактериальный штамм или композицию вводят не реже одного раза в неделю, предпочтительно, не реже двух раз в неделю, более предпочтительно, не реже одного раза в сутки и даже более предпочтительно не реже двух раз в сутки.

В одном варианте осуществления изобретения введенное за сутки количество *Akkermansia glycaniphilus* составляет от около 10^4 до около 10^{15} клеток или колониеобразующих единиц (КОЕ). Например, кишечные бактерии можно вводить в количестве от около 10^6 или 10^7 клеток или КОЕ до около 10^{14} клеток или КОЕ в сутки, предпочтительно от около 10^8 клеток или КОЕ до около 10^{13} клеток или КОЕ в сутки, предпочтительно от около 10^9 клеток или КОЕ до около 10^{12} клеток или КОЕ в сутки, более предпочтительно от около 10^{10} клеток или КОЕ до около 10^{12} клеток или КОЕ в сутки.

В одном из вариантов осуществления изобретения, бактериальный штамм или композицию вводят субъекту с избыточной массой тела или субъекту с ожирением. В одном варианте осуществления изобретения у субъекта диагностирован метаболический синдром, например, метаболическое нарушение, свя-

занное с избыточной массой тела и/или ожирением. В другом варианте осуществления изобретения для указанного субъекта существует риск развития метаболического нарушения, например, метаболического нарушения, связанного с избыточной массой тела и/или ожирением. Например, такой риск может быть связан с фактом избыточной массы тела или ожирением у субъекта.

Альтернативно или дополнительно указанный риск соответствует предрасположенности, например, наследственной предрасположенности к метаболическому нарушению, например, метаболическому нарушению, связанному с избыточной массой тела и/или ожирением.

Субъект может принадлежать к любой возрастной группе (например, дети первых двух лет жизни, взрослые, пожилые) и любому полу (мужчина и женщина). В одном варианте осуществления изобретения млекопитающим является ребенок первых двух лет жизни (например, новорожденный, ребенок до года, ребенок от года до 2 лет и т.п.), в частности, родившийся преждевременно ребенок моложе 2 лет.

В одном варианте осуществления изобретения уровень штамма *Akkermansia muciniphila* в микробиоте кишечника субъекта резко снижен. Например, процент *Akkermansia muciniphila* в микробиоте кишечника субъекта может составлять менее 1%, более предпочтительно, менее 0,5%, более предпочтительно, менее 0,1% от общей численности бактериальных клеток в кишечнике.

Настоящее изобретение также относится к косметическому применению *Akkermansia glycaniphilus* для содействия снижению массы тела субъекта.

Таким образом, в настоящем изобретении также предложены косметическая композиция, содержащая косметически эффективное количество *Akkermansia glycaniphilus*, и использование этой композиции для содействия снижению массы тела субъекта. В контексте настоящего изобретения термин "косметически эффективное количество" относится к количеству косметической композиции, необходимому и достаточному для содействия косметическому эффекту, например, стимуляции снижения массы тела субъекта.

В одном варианте осуществления изобретения косметически эффективное количество *Akkermansia glycaniphilus* составляет от около 10^4 до около 10^{15} клеток или колониеобразующих единиц (КОЕ). Например, кишечные бактерии могут быть введены в количестве от около 10^6 или 10^7 клеток или КОЕ до около 10^{14} клеток или КОЕ в сутки, предпочтительно от около 10^8 клеток или КОЕ до около 10^{13} клеток или КОЕ в сутки, предпочтительно от около 10^9 клеток или КОЕ до около 10^{12} клеток или КОЕ в сутки, более предпочтительно от около 10^{10} клеток или КОЕ до около 10^{12} клеток или КОЕ в сутки.

В ещё одном варианте осуществления изобретения косметическую композицию вводят не реже одного раза в неделю, предпочтительно, не реже двух раз в неделю, более предпочтительно, не реже одного раза в сутки и даже более предпочтительно не реже двух раз в сутки.

В изобретении также предложен способ повышения уровня *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте млекопитающего, предпочтительно, человека, и указанный способ включает стадии:

введения выделенного штамма *Akkermansia glycaniphilus* по любому из пп.1-4 формулы изобретения, или композиции по любому из пп.5-8 формулы изобретения, указанному млекопитающему; и

стимуляции роста указанного штамма *Akkermansia glycaniphilus* в ЖКТ указанного млекопитающего путем введения млекопитающему соединения, которое выбирают из группы, включающей соединения, содержащие в качестве структурных звеньев глюкозамин или производные глюкозамина, такие как N-ацетилглюкозамин, и полифенолы.

В частности, примером соединения, содержащего глюкозамин или производные глюкозамина, является хитин. Полифенолы могут, например, содержаться в клюкве, винограде или других описанных продуктах растительного происхождения (см. публикацию Anhe FF et al. Gut Microbes. 2016 Feb 22:0. [электронная публикация до выхода в печать]).

На основании описания и приведённых ниже примерах специалист в данной области, используя существенные характеристики настоящего изобретения, без отступления от существа и объема настоящего изобретения, сможет внести разнообразные изменения и модификации в изобретение, чтобы адаптировать его к разнообразным применениям и условиям. Таким образом, из предшествующего описания специалисту будут очевидны разнообразные модификации изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе. Предполагается, что такие модификации также входят в объем формулы изобретения.

Примеры

Материалы и методы.

Источник и выращивание микроорганизма.

Штамм *Ryt^T* был получен во время выделения муколитических бактерий из свежих фекалий сетчатого питона (*Malayopython reticulatus*), размещенного в зоопарке Бергерс (Арнем, Нидерланды), при использовании анаэробной основной среды, содержащей 0,5% муцина в качестве единственного источника углерода и энергии, ранее описанной как муциновой среды (Derrien, Vaughan, Plugge & de Vos, 2004. Int J Syst Evol Microbiol 54:1469-1476). В целях сравнения использовали штамм *A. muciniphila Muc^T* (CIP 107961^T). Для выделения штамма *Ryt^T* использовали разведение до приближения к экстинкции на муциновой среде с последующим пересевом штрихом на чашки с муциновым агаром, представлявшим собой муциновую среду с добавлением 0,8% агара (Agar noble; Difco). Отбирали одиночные колонии, перено-

силы их для выращивания в муциновую среду и переседали штрихом на чашки с муциновым агаром до получения чистой культуры.

Генетические методы: Филогенетический и геномный анализ.

Проведен анализ нуклеотидной последовательности клонированного гена 16S рРНК, чтобы определить филогенетическую принадлежность штамма *Pyt*^T. Для выделения общей ДНК использовали набор грамположительной ДНК для очистки (Epicenter), и последовательности гена 16S рРНК амплифицировали методом ПЦР, используя универсальные праймеры 27F и 1492R (Suzuki, Taylor & DeLong, 2000. *Appl Environ Microbiol* 66:4605-4614), и для очистки продуктов ПЦР использовали набор для получения особо чистых продуктов ПЦР High Pure PCR Cleanup Micro (Roche Diagnostics). Для того чтобы получить почти полноразмерную последовательность гена 16S рРНК rRNA штамма *Pyt*^T, очищенные продукты ПЦР клонировали в клетках *Escherichia coli* XL 1-blue, используя простую векторную систему pGEM-T (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Плазмидную ДНК выделяли из 44 культур трансформантов с помощью набора QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) и использовали в качестве матрицы для анализа последовательности методом Сэнгера (выполненного по технологии GATC) с использованием праймеров к промоторам T7 и SP6, фланкирующим вставку (Promega). Для выравнивания последовательностей использовали DNABaser, и выравнивание было исправлено вручную, чтобы гарантировать перекрывающиеся последовательности. Было обнаружено, что все клонированные вставки являются производными идентичного гена 16S рРНК, и получена последовательность, содержащая 1439 п.н. Последовательности гена 16S рРНК штамма *Pyt*^T и других представителей типа Verrucomicrobia были выровнены при использовании программы SINA (<http://www.arb-silva.de/aligner/>: Pruesse, Peplies & Glockner, 2012. *Bioinformatics* 28:1823-1829). Для реконструкции филогенетических деревьев использовали программное обеспечение ARB (Ludwig, Strunk, Westram et al., 2004. *Nucleic Acids Res* 32:1363-1371). Для определения расстояний и кластеризации методами присоединения соседа и максимальной экономии использовали бутстреп-значения, основанные на 1000 репликаций.

Для дополнительного подтверждения филогенетического положения штамма *Pyt*^T и изучения его геномных взаимосвязей была частично определена геномная последовательность этого штамма. Общую ДНК, выделенную, как описано выше, использовали для получения библиотеки MiSeq, которую подвергали секвенированию нового поколения на персональном секвенаторе Illumina MiSeq с парноконцевыми прочтениями фрагментов размером 250 п.н. и размером вставки 500 п.н. Для сбора прочтений использовали Ray (k-мер 101) (Boisvert, Raymond, Godzaridis et al., 2012. *Genome Biol* 13:R122).

Аннотацию выполняли с использованием внутреннего биоинформационного конвейера, включающего Prodigal v2.5 для прогнозирования кодирующих белок последовательностей ДНК (CDS) (Hyatt, Chen, Locascio et al., 2010. *BMC bioinformatics* 11:119), InterProScan 5RC7 для аннотации белков (Hunter, Jones, Mitchell et al., 2012. *Nucleic Acids Res* 40:D306-312), tRNAscan-SE v1.3.1 для прогнозирования тРНК (Lowe & Eddy, 1997. *Nucleic Acids Res* 25:955-964) и RNAmmer v1.2 для прогнозирования тРНК (Lagesen, Hallin, Rodland et al., 2007. *Nucleic Acids Res* 35:3100-3108). Дополнительные прогнозы функции белка получали с помощью BLAST-идентификации посредством сравнения с базами данных UniRef50 (Suzek, Huang, McGarvey et al., 2007. *Bioinformatics* 23:1282-1288) и Swissprot (UniProt-Consortium, 2014) (загруженными в августе 2013). Впоследствии аннотация была дополнительно усилена в результате добавления ЕС-номеров из версии PRIAM 2013-03-06 (Claudel-Renard, Chevalet, Faraut et al., 2003. *Nucleic Acids Res* 31:6633-6639). При использовании базы данных RFAM, версия 11.0, rfam_scan.pl v1.04 кодирующие ДНК не обнаружены (Burge, Daub, Eberhardt et al., 2013. *Nucleic Acids Res* 41:D226-232).

Для экспериментов по ДНК-ДНК-гибридизации (DDH; ДДГ) клетки штаммов *Pyt*^T и *Muc*^T были выращены и собраны в стационарной фазе, после чего осадок был ресуспендирован в H₂O:изо-пропанол (1:1). Далее эксперименты методом DDH проводились сотрудниками Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) института Лейбница (Брауншвейг, Германия), как было описано ранее (Cashion, Holder-Franklin, McCully et al., 1977. *Anal Biochem* 81:461-466; Deley, Cattoir & Reynaert, 1970. *Eur J Biochem* 12:133; Huss, Festl & Schleifer, 1983. *Syst Appl Microbiol* 4:184-192).

Выраженное в процентах содержание Г+Ц в геномной ДНК штамма *Pyt*^T определяли сотрудники Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) института Лейбница (Cashion, Holder-Franklin, McCully & Franklin, 1977. *Anal Biochem* 81:461-466; Mesbah, Premachandran & Whitman, 1989. *Int J Syst Bacteriol* 39:159-167, Tamaoka & Komagata, 1984. *FEMS Microbiol Lett* 25:125-128).

Определение фанотипических характеристик: морфология, физиология и хемотаксономия.

Окрашивание по Граму проводили по известной методике (Plugge, Zoetendal & Stams, 2000. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 3:1155-1162). Для наблюдения за морфологией, подвижностью и способностью к образованию спор использовали фазово-контрастную микроскопию, клетки выращивали в течение 2 суток при 37°C на муциновой среде. Для определения присутствия капсулы клетки, выращенные на муциновой среде, окрашивали суспензией угольных частиц.

Для анализа методом сканирующей электронной микроскопии клетки фиксировали в 2%-ном растворе глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 2 ч при комнатной температуре и затем дополнительно в течение 30-60 минут в 2% тетроксиде осмия. После этого выполняли обез-

воживание клеток в серии растворов спирта разной концентрации (50%, 70%, 96% и 100%), и в заключение обрабатывали гексаметилдисилазаном, наносили на алюминиевую основу и покрывали платиной. После этого клетки изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа FEI Quanta 250 FEG.

Эксперименты по росту клеток выполняли в двух повторностях для каждого штамма, используя флаконы с сывороткой вместимостью 30 мл. Газовая фаза представляла собой N₂/CO₂ (80:20, отношение объемов), 1,5 атм. Общие условия выращивания: pH 6,5, температура 37°C, если не указано иное. Мониторинг роста осуществляли, измеряя на спектрофотометре (Ultraspec 10, Biosciences) оптическую плотность при длине волны 600 нм (OD600). Содержание короткоцепочечных жирных кислот измеряли на оборудовании для ВЭЖХ со спектральной системой Thermo Electron, оснащенной колонкой Agilent Met-acarb.

Оптимальную температуру и pH измеряли в двух повторностях на бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (ВНИ; Difco) с добавлением 0,5% (отношение массы к объему) муцина из желудка свиньи (тип III, Sigma) и 0,05% (отношение массы к объему) цистеина. Протестированные температуры составляли от 10 до 55°C с инкрементом 5°C; рост определяли при pH 3,5-0, повышая на 0,5 единиц pH (при использовании для коррекции pH HCl или NaOH) при 37°C. Культуры инкубировали не менее 1 месяца.

Рост на D-маннозе, D-глюкозе, L-фукозе, D-фруктозе, D-галактозе, N-ацетилглюкозамине, N-ацетилгалактозамине, D-целлобиозе тестировали в двух повторностях при концентрации 10 мМ в ранее описанной основной среде (Derrien, Vaughan, Plugge & de Vos, 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1469-1476), с добавлением триптона в концентрации 16 г/л и треонина 4 г/л. Рост на D-глюкозе, D-мальтозе, D-лактозе, D-манните, D-сахарозе, салицине, D-ксилозе, L-арабинозе, глицероле, D-целлобиозе, D-маннозе, D-мелезитозе, D-раффинозе, D-сорбите, L-рамнозе и D-трегалозе определяли при использовании API® 20A (bioMérieux, Франция) в соответствии с инструкциями производителя с одним изменением: для инокуляции API® 20A в качестве основной среды использовали описанную ранее (Derrien, Vaughan, Plugge & de Vos, 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1469-1476) с добавлением триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л. Затем определяли каталазную активность, проводя реакцию с 3% (отношение массы к объему) раствором H₂O₂. Для определения образования индола и уреазы и также гидролиза желатина и эскулина также использовали полоски API® 20A (bioMérieux, Франция).

Для определения резистентности к антибиотикам использовали метод Etest для ампициллина и ванкомицина (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Франция). Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли после 48-часовой инкубации. Более подробно, штамм Pyl^T выращивали на муциновой среде, и после достижения стационарной фазы 100 мкл высевали на чашки со средой ВНИ с добавлением 0,5% (отношение объемов) муцина из желудка свиньи (тип III, Sigma), и 0,05% (отношение объемов) цистеина гидрохлорида (Sigma-ALdrich). Чашки инкубировали в течение 24-48 часов в строго анаэробных условиях. Для интерпретации МИК грамотрицательных анаэробных бактерий определяли уровень резистентности, используя таблицу предельных значений чувствительности Европейского комитета по тестированию на антимикробную чувствительность EUCAST (версия 5.0, действительна с 01-01-2015).

Для определения хемотаксономических характеристик штаммы Pyl^T и Muc^T выращивали и собирали в стационарной фазе с последующей лиофилизацией. Анализ жирных кислот в клетке выполняли сотрудники Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) института Лейбница по описанной ранее методике (Kampfner & Kroppenstedt, 1996. *Can J Microbiol* 42:989-1005).

Результаты.

Филогенетические и геномные характеристики.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма Pyl^T включала непрерывный фрагмент длиной 1437 п.н. Расчеты сходства последовательностей, выполненные после анализа методом присоединения соседа, показали, что ближайшим родственным штамму Pyl^T является штамм *A. muciniphila* Muc^T (94,4%). Сходство последовательностей 16S рРНК существенно меньше применяемого в настоящее время порога отсечения для видов, равного 97% (Tindall, Rossello-Mora, Busse et al., 2010. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249-266). Примечательно, что последовательность гена 16S рРНК штамма Pyl^T продемонстрировала 99,7% сходства с диким клоном, выделенным из фекалий морского млекопитающего дюгоня (AB264081). С представителями всех достоверно описанных родов, принадлежащих к типу *Verrucomicrobiae*, включая семейства *Rubritaleaceae*, *Akkermansiceae*, and *Verrucomicrobiaceae* степень сходства последовательностей оказалась меньше (<90,0%).

Штамм.

В экспериментах DDH продемонстрировано относительно небольшое сходство штамма Pyl^T с типовым штаммом Muc^T (28,3% ± 5,2). Содержание пары ГЦ составило 58,2 мол.%.

При определении полного генома штамма Pyl^T методом одномолекулярного секвенирования PacBio было обнаружено, что геном состоит из одной хромосомы длиной 3 074 121 п.н. при содержании пары ГЦ 57,6%. Геном штамма Pyl^T на 400 т.п.н. длиннее генома штамма Muc^T (2,66 млн п.н.). Расчетное содержание (в %) пары Г+Ц в ДНК штамма Pyl^T, равное 57,6 %, хорошо согласуется с определенным в эксперименте значением (58,2 %), но несколько выше значения, полученного для штамма Muc^T (56,0 %). Установленное с использованием программного обеспечения Blast сходство (>5 т.п.н.) генома штамма

P_{yt}^T и генома штамма Muc^T составило 82,0%. При использовании метода средней нуклеотидной подлинность (ANI) сходство генома штамма P_{yt}^T с геномом штамма Muc^T составило 79,7%. Высказано предположение, что метод ANI может быть точной заменой метода ДДГ (Goris, Konstantinidis, Klappenbach et al., 2007. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81-91). Представленные данные подтверждают истинность этого предположения для типа *Verrucomicrobia* и показывают, что значения, полученные при определении степени сходства методами ANI и DDH, существенно меньше применяемого в настоящее время порога отсечения для видов, равного 70% для DDH и 95% для ANI.

Геном штамма P_{yt}^T отражает способность этого штамма вызывать разложение муцины, и, согласно прогнозам, кодирует 55 гликозидгидролаз, 28 из которых предположительно являются секретируемыми, 5 фукозидаз, 3 из которых предположительно являются секретируемыми, и 7 сиалидаз, 6 из которых предположительно являются секретируемыми. Для разложения муцинового гликопротеина необходимо отщепить сульфатные группы, которые могут присоединяться в конце гликановых цепей. Согласно прогнозам штамм P_{yt}^T кодирует 14 сульфатаз, 9 из которых предположительно являются секретируемыми. Геном штамма P_{yt}^T также содержит гены цитохром bd убиноксидазы и Ni-зависимой гидрогеназы, что указывает на потенциальное аэробное дыхание, которое штамм может использовать на аэробно-анаэробной границе раздела муцинового слоя кишечника.

Муциновые гликаны состоят, в основном, из галактозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, и штамм P_{yt}^T способен использовать все эти вещества в качестве питательного субстрата. В отличие от штамма *A. muciniphila* Muc^T штамм P_{yt}^T способен использовать галактозу в качестве единственного источника углерода, образуя при этом, главным образом, пропионат, ацетат и небольшое количество сукцината. На галактозе штамм растет относительно медленно (> 1 недели) по сравнению с ростом на муцине (<16 часов). Прогнозирование генома показало, что штамм P_{yt}^T кодирует только ферменты метаболизма Leloir галактокиназу (GalK) и УДФ-глюкозо-4-эпимеразу (GalE). Согласно прогнозам, эти ферменты кодирует также штамм Muc^T (van Passel, Kant, Zoetendal, Plugge, Derrien, Malfatti, Chain, Woyke, Palva, de Vos & Smidt, 2011. *Plos one* 6:e16876). Однако мы смогли идентифицировать в геноме штамма P_{yt}^T 8 генов, отсутствующих в геноме штамма Muc^T, которые кодируют белки со связывающим галактозу доменом, и 7 из этих 8 белков являются секретируемыми. Вероятно, штамм P_{yt}^T осуществляет метаболизм галактозы по пока еще неизвестному пути, и эти гены могут быть участниками системы связывания и транспортировки галактозы.

Морфология.

Клетки штамма имеют овальную форму, неподвижные и негитивные при окрашивании по Граму. Размер по длинной оси одиночной клетки, выросшей на муциновой среде, составляет 0,6-1,0 мкм. Встречаются одиночные клетки, пары клеток, короткие цепочки и агрегаты клеток. После выращивания на муциновом агаре при 37°C в течение 48 часов штамм P_{yt}^T представляет собой небольшие белые колонии с диаметром колонии 0,7 мм. СЭМ продемонстрировала существование нитевидных структур, соединяющих отдельные бактериальные клетки. Клетки штамма P_{yt}^T могут не включать угольные частицы, что характерно для бактерий, обладающих капсулой.

Физиология.

Штамм P_{yt}^T являлся строгим анаэробом, растущим в присутствии восстановителей L-цистеин и/или сульфида. Рост наблюдался при 15-40°C и pH 5,0-7,5, при этом оптимальные условия для роста составляли 25-30°C и pH 6,0. По сравнению со штаммом Muc^T штамм P_{yt}^T растет при несколько более низких температурах и значениях pH (таблица). Оптимальная температура 30°C соответствует естественной среде обитания штамма P_{yt}^T, так как питон является холоднокровным животным, у которого регуляция температуры тела зависит от внешних источников тепла, и поэтому температура тела питона ниже, чем у человека или мелких млекопитающих, которые являются его кормовым объектом (Wang, Zaar, Arvedsen et al., 2002. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133:519-527). У вида *Python bivittatus*, родственного виду *Malayopython reticulatus*, pH в желудочно-кишечном тракте варьирует от 6.5 (желудок) до 7.6 (слепая кишка) во время голодания, и от pH 2-3 (желудок), 7-8 (пищевод, дистальный отдел тонкого кишечника, слепая кишка и проксимальный отдел толстого кишечника) до 5-6,7 (дистальный отдел пищевода, проксимальный отдел желудка и дистальный отдел толстого кишечника) после приема пищи (Secor, Voback & Lignot, 2006. *Integr Comp Biol* 46). Эти данные показывают, что оптимальный pH штамма P_{yt}^T (приблизительно pH 6,0) может соответствовать колонизации дистального отдела толстого кишечника.

Демонстрирующий наилучший рост в муциновой среде и способный использовать муцин в качестве источника углерода, энергии и азота, штамм P_{yt}^T образовывал ацетат, пропионат и 1,2-пропандиол. Штамм P_{yt}^T был способен расти без витаминов на муциновой среде, но также был способен медленно расти на бульоне с сердечно-мозговым экстрактом и в основной среде на N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, D-глюкозе, D-лактозе и D-галактозе в присутствии триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л. На D-маннозе, L-фукозе, D-целлобиозе или D-фруктозе в основной среде с добавлением триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л рост отсутствовал.

При использовании полосок API® 20A (bioMérieux, Франция) с основной средой с добавлением триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л рост штамма P_{yt}^T наблюдался на D-глюкозе, D-мальтозе и слабый рост на D-лактозе при отсутствии роста на D-манните, D-сахарозе, сали-

цине, D-ксилозе, L-арабинозе, глицероле, D-целлобиозе, D-маннозе, D-мелезитозе, D-раффинозе, D-сорбите, L-рамнозе, D-трегалозе. Присутствовала каталазная активность.

Результаты тестов на образование индола и уреазы были негативными, на желатин и гидролиз эскулина - позитивными.

Штамм *Ryt*^T способен также использовать лактозу в качестве единственного источника углерода, образуя при этом, в основном, пропионат и ацетат. Рост на лактозе более медленный (Td приблизительно 4 часа), чем на муцине (Td приблизительно 1 час). При количественном определении продуктов сбраживания методом ВЭЖХ было обнаружено, что вначале происходит расщепление лактозы с образованием глюкозы и галактозы. Затем и глюкоза, и галактоза превращались, главным образом, в пропионат и ацетат и небольшое количество сукцината. Сетчатый питон не является лактирующим млекопитающим, поэтому способность штамма *Ryt*^T использовать лактозу в качестве питательного субстрата оказалась неожиданной. Однако в молекуле муцинового гликопротеина имеются многочисленные β4-гликолитические связи (Linden, Sutton, Karlsson et al., 2008. *Mucosal Immunol* 1:183-197). В молекуле лактозы имеется аналогичная β4-связь между глюкозой и галактозой. Таким образом, для того чтобы использовать муцин в качестве питательного субстрата, штамму *Ryt*^T нужно быть способным к расщеплению гликановой связи, и, вероятно, что штамм *Ryt*^T может разлагать лактозу, используя тот же фермент, который он обычно использует для разложения муцина.

Анализ с использованием метода Etest (bioMérieux, Франция) показал относительную резистентность штамма *Ryt*^T к ампициллину (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составила 32 мкг/мл) и ванкомицину (МИК 24 мкг/мл), при чувствительности ко всем другим клинически значимым антибиотикам, включая цефалоспорины, фторхинолоны, аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, метронидазол, хлорамфеникол, рифампицин и колистин.

Результаты определения физиологических характеристик штамма *Ryt*^T представлены в описании вида и показаны в таблице в сравнении с другими представителями типа *Verrucomicrobiae*.

Физиологические характеристики типовых штаммов вида *Akkermansia* в сравнении с характеристиками представителей других родов семейства *Verrucomicrobiae* (подсемейство I).

Характеристика	1	2	3	4	5
Морфология клетки	Овальные	Овальные	Кокковидные или палочковидные	Веретеновидные палочковидные	Веретеновидные палочковидные
Размер клетки (мкм)	0,6-1,0	0,6-1,0	0,5-1,0 или 0,5-1,0x 0,8-1,5	0,5x2,0 – 8,0	0,8-1,0 x 1,0-3,8
Аэробный рост	-	-	+	+	+
Температурный диапазон для роста (°C)	15-37	20-40	4-37‡	1-40‡	26-34
Оптимальная температура (°C)	30	37	30-37‡	н.о.	26-33
Диапазон pH для роста	5,0-7,5	5,5-8,0	6,5-8,5‡	н.о.	н.о.
Оптимальный pH для роста	6,0	6,5	н.о.	н.о.	н.о.
Капсула	+	+	н.о.	н.о.	н.о.
Рост на:					
глюкозе	+‡	+‡	+	+	+
галактозе	+‡	-	+/-‡	+	+
фукозе	-	+			
фруктозе	-	-	+	+/-‡	+
целлобиозе	-	-	+/-‡	+	+
N-ацетилглюкозамине	+‡	+‡	+/	+/-‡	+
N-ацетилгалактозамине	+‡	+‡	+/	н.о.	н.о.
муцине	+	+	н.о.	н.о.	н.о.
Содержание Г+Ц в ДНК (моль%)	58,2	47,6	47,7-52,4	54,6-60,1	57,9-59,3

ИСТОЧНИК ДАННЫХ: HEDLUND, 2010. Тип XXIII. VERRUCOMICROBIA PHYL. NOV. (СПРАВОЧНИК ПО СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИОЛОГИИ БЕРДЖИ. 2-е издание: SPRINGER-VERLAG, NEW YORK).

ШТАММЫ: 1- *A. GLYCANOPHILUS* PУТ^T; 2- *A. MUCINIPHILA* MUC^T; 3- *RUBRITALEA* (ОСНОВАННЫЙ НА *R. MARINA*, *R. SABULI*, *R. SPONGIAE*, *R. SQUALLENIFACIENS* И *R. TANGERINA*); 4- *PROSTHECOBACTER* (ОСНОВАННЫЙ НА *P. DEBONTII*, *P. DEJONGEII*, *P. FUSIFORMIS* И *P. VANNEERVENII*); 5- *VERRUCOMICROBIUM* (ОСНОВАННЫЙ НА *VERRUCOMICROBIUM SPINOSUM*);

+ ПОЗИТИВНЫЙ; – НЕГАТИВНЫЙ; (+) СЛАБО ПОЗИТИВНЫЙ; † В ПРИСУТСТВИИ ТРИПТОНА В КОНЦЕНТРАЦИИ 16 Г/Л И ТРЕОНИНА 4 Г/Л; ‡ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА.

ВСЕ ШТАММЫ НЕПОДВИЖНЫЕ И НЕГАТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ПОТРЕБНОСТИ В ВИТАМИНАХ. ВСЕ ШТАММЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫ К АМПИЦИЛЛИНУ.

Н.О. НЕ ОПРЕДЕЛЕНО.

Описание штамма *Akkermansia glycanophilus* sp. nov.

Akkermansia glycanophilus (гликанофил, полученный из гликана; гликанофильный - адаптированный к гликанам).

Клетки овальной формы, неподвижные и негативные при окрашивании по Граму. Размер по длинной оси одиночной клетки, выросшей на муциновой среде, составляет 0,6-1,0 мкм. Встречаются одиночные клетки, пары клеток, короткие цепочки и агрегаты клеток. Клетки покрыты филаментами. После выращивания на мягком муциновом агаре штамм представляет собой небольшие белые колонии с диаметром колонии 0,7 мм. Клетки штамма PУТ^T не включают угольные частицы, что характерно для бактерий, обладающих капсулой. Рост наблюдается при температуре 15-40°C и pH 5,0-7,5, оптимальные условия роста - температура 25-30°C и pH 6,0. Строго анаэробные или микроаэрофильные бактерии. Способны расти на желудочном муцине и бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, и в основной среде с добавлением триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л на N-ацетилглюкозамине, N-ацетилгалактозамине, глюкозе, лактозе и галактозе. На L-фукозе, D-целлобиозе или D-фруктозе в основной среде с добавлением триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л рост отсутствовал. В эксперименте с использованием API® 20A (bioMérieux, Франция) на такой же основной среде с добавлением триптона в концентрации 16 г/л и треонина в концентрации 4 г/л наблюдался рост на D-глюкозе, D-мальтозе и слабый рост на D-лактозе при отсутствии роста на D-манните, D-сахарозе, салицине, D-ксилозе, L-арабинозе, глицероле, D-целлобиозе, D-маннозе, D-мелезитозе, D-раффинозе, D-сорбите, L-рамнозе, D-трегалозе. положительный результат теста на каталазную активность. Результаты тестов на образование индола и уреазы были негативными, на желатин и гидролиз эскулина - позитивными. Штамм способен использовать муцин в качестве единственного источника углерода, энергии и азота. Растет в отсутствие витаминов. Содержание нуклеотидов Г+Ц в ДНК 58,2 мол.%. Жирные кислоты в клетке представлены, главным образом, антеизо-жирными кислотами C_{15:0}, C_{15:0} и C_{16:0}. Выделен из фекалий сетчатого питона в Вагенингене, Нидерланды. Типовой штамм PУТ^T (=DSM 100705= CIP 110913T).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная бактерия *Akkermansia glycaniphilus*, депонированная под номером CBS141023 в Центральном бюро культур плесени, Нидерланды, для стимуляции функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника и поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности мукозального барьера кишечника у млекопитающего.

2. Композиция, содержащая выделенную бактерию *Akkermansia glycaniphilus* по п.1 и физиологически приемлемый носитель, для стимуляции функции иммунной системы слизистой оболочки кишечника и поддержания, восстановления и/или повышения физической целостности мукозального барьера кишечника у млекопитающего.

3. Композиция по п.2, представляющая собой фармацевтическую композицию, предпочтительно в виде твердой лекарственной формы, такой как капсула, таблетка или порошок.

4. Композиция по п.2 или 3, где указанный штамм бактерии *Akkermansia glycaniphilus* присутствует в лиофилизированной или микроинкапсулированной форме.

5. Композиция по любому из пп.2-4, где указанный штамм *Akkermansia glycaniphilus* присутствует в количестве от 10⁴ до 10¹⁵ клеток.

6. Применение композиции по любому из пп.2-5 для профилактики и/или лечения нарушения, выбранного из группы, включающей метаболический синдром, ожирение, недостаточность инсулина или нарушения, связанные с резистентностью к инсулину, синдром раздраженного кишечника, нарушение толерантности к глюкозе, аномальный метаболизм липидов, гипергликемию, дислипидемию, сопровождающуюся ожирением, дисфункцию иммунной системы слизистой оболочки кишечника, высокое содержание холестерина и повышенное содержание триглицеридов.

7. Применение выделенной бактерии *Akkermansia glycaniphilus* по п.1 для профилактики и/или лечения нарушения, выбранного из группы, включающей метаболический синдром, ожирение, аномальный метаболизм липидов, гипергликемию, дислипидемию, сопровождающуюся ожирением, дисфункцию иммунной системы слизистой оболочки кишечника, высокое содержание холестерина и повышенное содержание триглицеридов.

8. Применение выделенной бактерии *Akkermansia glycaniphilus* по п.1 в качестве пробиотика или симбиотика.

9. Применение композиции по любому одному из пп.2-5 в качестве пробиотика или симбиотика.

10. Применение выделенной бактерии *Akkermansia glycaniphilus* по п.1 для содействия снижению массы тела.

11. Применение композиции по любому из пп.2-5 для содействия снижению массы тела.

12. Способ повышения уровня бактерии *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте млекопитающего, включающий стадии: введения выделенной бактерии *Akkermansia glycaniphilus* по п.1 указанному млекопитающему; и

стимуляции роста указанного штамма *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте млекопитающего путем введения указанному млекопитающему соединения, которое выбирают из группы, включающей соединения, содержащие в качестве структурных звеньев глюкозамин или производные глюкозамина, такие как N-ацетилглюкозамин, и полифенолы.

13. Способ повышения уровня бактерии *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте млекопитающего, включающий стадии:

введения композиции по любому одному из пп.2-5 указанному млекопитающему; и

введения указанному млекопитающему соединения, которое выбирают из группы, включающей глюкозамин или производные глюкозамина, такие как N-ацетилглюкозамин, и полифенолы.

14. Композиция, содержащая выделенную бактерию *Akkermansia glycaniphilus* по п.1 и соединение, которое выбирают из группы, включающей глюкозамин или производные глюкозамина, такие как N-ацетилглюкозамин, и полифенолы, для повышения уровня бактерии *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) млекопитающего и стимулирования роста указанной бактерии *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте млекопитающего.

15. Композиция по любому из пп.2-5, дополнительно содержащая соединение, которое выбирают из группы, включающей глюкозамин или производные глюкозамина, такие как N-ацетилглюкозамин, и полифенолы, для повышения уровня бактерии *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте млекопитающего и стимулирования роста указанной бактерии *Akkermansia glycaniphilus* в желудочно-кишечном тракте млекопитающего.

