

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 231**

51 Int. Cl.:

A61K 35/741 (2015.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2016 PCT/EP2016/071327**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042347**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2016 E 16763806 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021 EP 3347030**

54 Título: **Uso de Akkermansia pasteurizada para el tratamiento de trastornos metabólicos**

30 Prioridad:

10.09.2015 EP 15184758

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN (50.0%)
Place de l'Université 1
1348 Louvain-la-Neuve, BE y
WAGENINGEN UNIVERSITEIT (50.0%)

72 Inventor/es:

CANI, PATRICE;
EVERARD, AMANDINE;
PLOVIER, HUBERT;
DRUART, CÉLINE;
DE VOS, WILLEM y
BELZER, CLARA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 883 231 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de Akkermansia pasteurizada para el tratamiento de trastornos metabólicos

5 Campo de invención

La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos metabólicos, tales como, por ejemplo, trastornos metabólicos relacionados con el sobrepeso y la obesidad, tales como, por ejemplo, Diabetes Mellitus o colesterol alto. La presente invención se refiere más específicamente a una composición que comprende Akkermansia spp. Pasterizada o fragmentos de la misma para tratar un trastorno metabólico.

Antecedentes de la invención

La obesidad es un problema mundial, con un número estimado de adultos obesos de aproximadamente 600 millones. Esta epidemia de obesidad se correlaciona con un gran aumento de la prevalencia de trastornos relacionados con la obesidad como, por ejemplo, diabetes, hipertensión, patologías cardíacas y enfermedades hepáticas. Debido a estas patologías altamente discapacitantes, la obesidad se considera actualmente en los países occidentales como uno de los problemas de salud pública más importantes. Por tanto, existe una necesidad real de composiciones y métodos para tratar o prevenir la obesidad y/o los trastornos relacionados con la obesidad.

La obesidad y las enfermedades relacionadas con la obesidad están asociadas con (i) disfunciones metabólicas (con un impacto en la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de los lípidos, por ejemplo); (ii) estado inflamatorio de bajo grado asociado a niveles más altos de lipopolisacáridos en sangre (LPS) (también denominada endotoxemia metabólica); y (iii) función de barrera intestinal deteriorada (es decir, aumento de la permeabilidad intestinal) lo que conduce a la translocación de componentes de bacterias y/o microorganismos a órganos tales como el hígado o el tejido adiposo. Por tanto, para tratar la obesidad, se necesita el impacto en al menos uno, preferiblemente 2 y más preferiblemente 3 de estos 3 factores. Estos fenómenos (es decir, inflamación intestinal, LPS y translocación bacteriana) también se observan durante enfermedades inflamatorias del intestino, como por ejemplo enfermedades de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, dolor intestinal (por ejemplo, cólicos) y otras enfermedades inflamatorias intestinales. Curiosamente, tanto las enfermedades inflamatorias del intestino como las enfermedades relacionadas con la obesidad están asociadas con cambios en la composición de la microbiota intestinal. Por lo tanto, el refuerzo de la función de barrera intestinal es uno de los principales problemas.

El intestino humano está colonizado por una comunidad diversa, compleja y dinámica de microbios que representan más de 1000 especies diferentes, que interactúan continuamente con el huésped (Zoetendal et al., 2008. Gut. 57(11):1605-1615; Rajilic- Stojanovic y de Vos, 2014. FEMS Microbiol. Rev. 38:996-1047). La homeostasis de la microbiota intestinal depende de las características del huésped (edad, sexo, antecedentes genéticos...) y de las condiciones ambientales (estrés, fármacos, cirugía gastrointestinal, agentes infecciosos y tóxicos ...), pero también los cambios dietéticos del día a día. Las crecientes evidencias apoyan la función de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y trastornos relacionados (Delzenne & Cani, Annu. Rev. Nutr. 2011, 31: 15-31).

Recientemente se ha reconocido que la microbiota intestinal está involucrada en una serie de trastornos cerebrales, tales como ansiedad, autismo (Hsiao et al., 2013. Cell. 155 (7): 1451-1463), enfermedad de Parkinson (Scheperjans et al., 2015. Mov. Disord. 30 (3): 350-8), enfermedad de Alzheimer (Harach et al., 2015. arXiv: 1509.02273), y en la esclerosis múltiple (Berer et al., 2011. Nature. 479 (7374) : 538-41).

También se demostró que el desequilibrio de la microbiota intestinal es un factor de riesgo para el desarrollo de cánceres tales como el cáncer colorrectal (Zitvogel et al., 2015. Sci. Transl. Med. 7 (271): 271ps1; Louis et al., 2014. Nat. Rev. Microbiol. 12 (10): 661-72).

Las crecientes evidencias también apoyan el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y trastornos relacionados (Delzenne & Cani, 2011. Annu. Rev. Nutr. 31: 15-31) y la inflamación intestinal (Wlodarska et al., 2015. Cell Host Microbe 17 (5): 577-91), o dolor intestinal (por ejemplo, cólicos de bebés) (de Weerth et al., 2013. Pediatrics. 131: e550). En todos estos casos (obesidad, inflamación intestinal, cólicos), la disbiosis de la microbiota puede alterar aún más la diafonía entre los órganos y la integridad de la barrera intestinal y provocar síntomas.

Por tanto, el tratamiento con productos que se dirigen a la microbiota intestinal apareció como herramientas terapéuticas prometedoras para tratar la obesidad y los trastornos relacionados. Estos productos pueden consistir en microbios vivos, como en el caso de la mayoría de los probióticos, o contener microbios muertos o fragmentos de los mismos. Además, estos productos pueden comprender sustratos que son utilizados por la microbiota intestinal, como en el caso de los prebióticos, o contener compuestos que modifiquen el equilibrio de la microbiota intestinal, como compuestos antimicrobianos específicos.

Por ejemplo, el documento WO 2008/076696 describe la microbiota intestinal como una diana terapéutica para tratar la obesidad y trastornos relacionados. El documento WO 2008/076696 divulga específicamente métodos para alterar

la abundancia de Bacteroides y/o Firmicutes en el intestino de un sujeto, mediante la administración de antibióticos y/o probióticos al sujeto.

Además, el documento EP 2 030 623 se refiere a la prevención y/o el tratamiento de trastornos metabólicos, tales como, por ejemplo, trastornos relacionados con la obesidad, mediante la regulación de la cantidad de enterobacterias en el intestino. El documento EP 2 030 623 describe la reducción de la cantidad de enterobacterias en el intestino mediante la administración de bacterias probióticas, tales como, por ejemplo, Bifidobacterium, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus o Lactobacillus.

La solicitud de patente US 2012/083514 se refiere a cereales para lactantes que comprenden microorganismos probióticos que no se replican. El documento US 2012/083514 describe tres tipos de tratamiento térmico: 140 °C durante 15 segundos (temperatura ultra alta); 74 °C, 90 °C y 120 °C durante 15 segundos (corto tiempo de alta temperatura); y 85 °C durante 20 minutos (temperatura baja durante mucho tiempo). Sin embargo, se muestra en esta solicitud de patente US 2012/083514 que la relación IL12/IL10 aumenta fuertemente en bacterias sometidas a tratamiento térmico a 85 °C durante 20 minutos. IL12 es una citoquina proinflamatoria, mientras que IL10 es una citoquina antiinflamatoria. El documento US 2012/083514 demuestra así que un tratamiento térmico a 85 °C durante 20 minutos aumenta el estado inflamatorio del sujeto y, por lo tanto, no se recomienda para tratar trastornos inflamatorios. Mientras tanto, el documento US 2012/083514 demuestra que las bacterias deben calentarse durante un tiempo muy corto (15 segundos) para presentar un perfil antiinflamatorio.

Además, el Solicitante describió que la microbiota intestinal se modifica en ratones obesos tratados con prebióticos (Everard et al., noviembre de 2011; Diabetes 60 (11): 2775-86). Además, los prebióticos (1) mejoran el metabolismo de la glucosa y los lípidos en ratones obesos y diabéticos, (2) reducen el LPS plasmático y mejoran la función de barrera intestinal (por ejemplo, reducción de la inflamación) en ratones obesos, (3) inducen un aumento del número de células L enteroendocrinas en ratones obesos y diabéticos, y (4) mejoran la sensibilidad a la leptina y la homeostasis de la glucosa en ratones obesos y diabéticos inducidos por la dieta.

El Solicitante también describió el uso de Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para tratar la obesidad y trastornos relacionados (documento WO 2014/076246). Además, el solicitante también divulgó una abundancia reducida de Akkermansia muciniphila en el intestino de pacientes que padecían colitis ulcerosa (Rajilc-Stojanović M et al., 2013 Mar. Inflamm. Bowel Dis. 19 (3): 481-8). En la enfermedad de Crohn, se encontró que las bacterias productoras de butirato estaban agotadas (Wlodarska et al., 2015. Cell Host Microbe. 17 (5): 577-91). Sin embargo, se demostró que Akkermansia muciniphila, que produce los propionato y acetato de ácidos grasos de cadena corta, también puede dar lugar a cadenas tróficas que producen butirato como producto final a partir del moco. Se sabe que el butirato reduce la sensación de dolor en el intestino y, al igual que el acetato y el propionato, muestra señales inmunitarias. Finalmente, se ha demostrado que la adición de Akkermansia muciniphila aumenta la función de barrera en una línea celular humana (Reunanen et al., 2015. Appl. Environ. Microbiol. 81 (11): 3655-62). Por lo tanto, es muy probable que Akkermansia muciniphila y sus productos puedan reducir el dolor y la inflamación intestinales así como el refuerzo de la barrera intestinal en humanos sanos así como en pacientes que padecen enfermedades inflamatorias intestinales. Esto puede aplicarse no solo a los adultos sino también a los bebés, ya que los productores reducidos de butirato se asociaron con el llanto excesivo en los cólicos del bebé y las enfermedades atópicas en los bebés pequeños (de Weerth et al., 2013. Gut Microbes. 4 (5): 416-21; Nylund et al., 2015. Allergy. 70 (2): 241-4).

Sin embargo, aquí, el solicitante demostró sorprendentemente que la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada es más eficaz que Akkermansia muciniphila no pasteurizada para aumentar la función de barrera y tratar las disfunciones metabólicas asociadas con la obesidad y trastornos relacionados. Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de Akkermansia muciniphila pasteurizada o fragmentos de la misma para aumentar la función de barrera y para tratar la obesidad y trastornos relacionados.

Resumen

La presente invención se refiere a Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto que lo necesite, en el que Akkermansia muciniphila está pasteurizada y en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; Intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica.

En una realización, Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para uso como se describe anteriormente en este documento se administra por vía oral.

En una realización, Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso como se describe anteriormente en el presente documento se administra al sujeto en una cantidad que varía de aproximadamente $1,10^4$ a aproximadamente $1,10^{12}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^5$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células, e incluso más preferiblemente de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células.

En una realización de la invención, *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma para su uso como se describe anteriormente se administran al menos tres veces por semana.

- 5 En una realización, *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma para su uso como se describe anteriormente en la presente se coadministra con otra cepa probiótica y/u otra bacteria y/o microorganismos con efectos beneficiosos y/o con uno o más prebióticos.

10 La presente invención también se refiere a una composición para su uso para tratar un trastorno metabólico en un sujeto que comprende *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma como se describe anteriormente en asociación con un excipiente, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica.

15 En una realización, dicha composición para uso es una composición nutricional. En una realización, dicha composición para uso se administra por vía oral.

20 Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica para tratar un trastorno metabólico en un sujeto que comprende *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma como se describe anteriormente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica.

25 La presente invención se refiere además a un medicamento para tratar un trastorno metabólico en un sujeto que comprende *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma como se describe anteriormente, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica.

Definiciones

40 En la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

• “Tratamiento” significa prevenir (es decir, evitar que suceda), reducir o aliviar al menos un efecto o síntoma adverso de una enfermedad, trastorno o afección. Por tanto, este término se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas; en el que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico objetivo. En una realización de la invención, los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como los que son propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

• “Cantidad efectiva” se refiere al nivel o cantidad de agente que se busca, sin causar efectos secundarios negativos o adversos significativos al objetivo, (1) retrasar o prevenir la aparición de un trastorno metabólico; (2) ralentizar o detener la progresión, agravamiento o deterioro de uno o más síntomas del trastorno metabólico; (3) provocar una mejora de los síntomas del trastorno metabólico; (4) reducir la gravedad o la incidencia del trastorno metabólico; (5) curar el trastorno metabólico; o (6) restaurar la cantidad y/o proporción normal de *Akkermansia muciniphila* en el intestino del sujeto a tratar. Puede administrarse una cantidad eficaz antes del inicio de un trastorno metabólico, para una acción profiláctica o preventiva. Alternativa o adicionalmente, la cantidad eficaz puede administrarse después del inicio del trastorno metabólico, para una acción terapéutica.

• “*Akkermansia muciniphila*” se refiere a las bacterias que degradan la mucina identificadas por Derrien (Derrien et al., 2004, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1469-1476). Las células tienen forma ovalada, inmóviles y con tinción Gram-negativa. *Akkermansia muciniphila* también puede denominarse *Akkermansia* spp. o bacterias similares a *Akkermansia*. Pertenece al grupo de Chlamydiae/Verrucomicrobia; Filo Verrucomicrobia. Si la taxonomía cambiara, el experto en la materia sabría cómo adaptar los cambios en la taxonomía para deducir las cepas que podrían usarse en la presente invención. Además, el Solicitante ha determinado el genoma completo de *Akkermansia muciniphila* (van Passel et al, 2011. PLoS One. 6(3):e16876). En general, se acepta que las cepas con una similitud de nucleótidos determinada experimentalmente por hibridación de ADN-ADN de aproximadamente el 70% se pueden considerar como la misma especie - esto corresponde a una identidad de nucleótidos promedio (ANI) de aproximadamente el 95% (Goris et al., 2007. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 81 - 91).

"Akkermansia muciniphila pasteurizada" se refiere a Akkermansia muciniphila sometida a un tratamiento de calentamiento. En una realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada se refiere a Akkermansia muciniphila que se calentó a una temperatura de 50 °C a 100 °C durante al menos 10 minutos.

• "Probióticos" se refiere a preparaciones de células microbianas (tales como, por ejemplo, células microbianas vivas) que, cuando se administran en una cantidad eficaz, proporcionan un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar de un sujeto. Por definición, todos los probióticos tienen un carácter no patógeno probado. En una realización, estos beneficios para la salud están asociados con la mejora del equilibrio de la microbiota humana o animal en el tracto gastrointestinal y/o la restauración de la microbiota normal.

• "Prebiótico" se refiere a una sustancia, como, por ejemplo, una sustancia alimenticia, que puede no ser digerida por humanos, pero que modula composiciones y/o actividad de la microbiota intestinal pero que modula la composición y/o actividad de la microbiota intestinal a través de su metabolización por microorganismos en el intestino, confiriendo así un efecto fisiológico beneficioso sobre el huésped.

• "Sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. En una realización, el sujeto es un hombre. En otra realización, el sujeto es una mujer. En una realización de la invención, un sujeto también puede referirse a una mascota, tal como, por ejemplo, un perro, un gato, un conejillo de indias, un hámster, una rata, un ratón, un hurón, un conejo y similares.

• "Sobrepeso" se refiere a una situación en la que dicho sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) que varía de 25 a 30. Como se usa en este documento, el IMC se define como la masa corporal del individuo (en kg) dividida por el cuadrado de su altura (en metros).

"Obesidad" se refiere a una situación de sujeto en la que dicho sujeto tiene un IMC superior o igual a 30.

• "Aproximadamente" antes de una cifra significa más o menos el 20 %, preferiblemente el 10 % del valor de dicha cifra.

• "Fragmento" puede referirse a componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas y compuestos resultantes del metabolismo de Akkermansia muciniphila pasteurizada y similares. Los fragmentos se pueden obtener, por ejemplo, recuperando el sobrenadante de un cultivo de Akkermansia muciniphila después de la pasteurización o extrayendo componentes celulares o fracciones celulares, metabolitos o compuestos secretados de un cultivo de Akkermansia muciniphila después de la pasteurización. El término fragmento también puede referirse a un producto de degradación. Un fragmento puede corresponder a un componente en forma aislada o a cualquier mezcla de uno o más componentes derivados de Akkermansia muciniphila pasteurizada. En una realización, un fragmento puede corresponder a uno o más de tales componentes presentes en Akkermansia muciniphila pasteurizada que se produce de otra manera, tal como usando tecnología de ADN recombinante, en un huésped microbiano o en cualquier otro proceso (bio) sintético.

• "Trastorno metabólico" se refiere a trastornos, enfermedades y afecciones causadas o caracterizadas por aumento de peso anormal, uso o consumo de energía, respuestas alteradas a nutrientes ingeridos o endógenos, fuentes de energía, hormonas u otras moléculas de señalización dentro del cuerpo o metabolismo alterado de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos o una combinación de los mismos. Un trastorno metabólico puede estar asociado con una deficiencia o un exceso en una vía metabólica que resulte en un desequilibrio en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y/o ácidos nucleicos. Los ejemplos de trastornos metabólicos incluyen, pero no se limitan a, síndrome metabólico, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, diabetes mellitus (como, por ejemplo, diabetes tipo 2), intolerancia a la glucosa, metabolismo anormal de lípidos, aterosclerosis, hipertensión, preeclampsia, patología cardíaca, accidente cerebrovascular, hígado graso no alcohólico, hiperglucemia, esteatosis hepática de diferente etiología, dislipidemia, disfunción del sistema inmunitario asociado con sobrepeso y obesidad, enfermedades cardiovasculares, colesterol alto, triglicéridos elevados, asma, apnea del sueño, osteoartritis, neurodegeneración, enfermedad de la vesícula biliar, síndrome X, trastornos inflamatorios e inmunitarios, dislipidemia aterogénica y cáncer.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones. El Solicitante muestra en el presente documento que los efectos beneficiosos sobre el metabolismo observados después de la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada son más importantes que después de la administración de Akkermansia muciniphila no pasteurizada (véanse los Ejemplos).

Por lo tanto, esta invención se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para su uso en el tratamiento de trastornos metabólicos en un sujeto que lo necesite, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa;

metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica.

- 5 Como se usa en este documento, un trastorno metabólico es un trastorno relacionado con una homeostasis metabólica alterada, tal como, por ejemplo, una homeostasis alterada de glucosa o lípidos.

En una realización de la invención, dicho trastorno metabólico es la obesidad.

- 10 Ejemplos de otros trastornos metabólicos incluyen, pero no se limitan a, síndrome metabólico, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, diabetes mellitus (como, por ejemplo, diabetes tipo 2), intolerancia a la glucosa, metabolismo anormal de lípidos, aterosclerosis, hipertensión, preeclampsia, patología cardíaca, accidente cerebrovascular, enfermedad del hígado graso no alcohólico, hiperglucemia, esteatosis hepática, dislipidemia, disfunción del sistema inmunitario asociada con sobrepeso y obesidad, enfermedades del hígado (tales como, por ejemplo, fibrosis asociada con la obesidad, o funciones hepáticas anormales, que incluyen cambios en la producción de bilis, inmunidad y similares), enfermedades inflamatorias, inmunitarias y de la función de barrera (tal como, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, incluida la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa y el síndrome del intestino irritable), enfermedades cardiovasculares, colesterol alto, triglicéridos elevados, asma, apnea del sueño, osteoartritis, neurodegeneración, enfermedad de la vesícula biliar, síndrome X, trastornos inflamatorios e inmunitarios, dislipidemia aterogénica y cáncer.

- 25 Como se divulga en el presente documento, dicho trastorno metabólico puede ser un trastorno metabólico relacionado con el sobrepeso y/o la obesidad, es decir, un trastorno metabólico que puede estar asociado o causado por el sobrepeso y/o la obesidad. Ejemplos de trastornos metabólicos relacionados con el sobrepeso y/o la obesidad incluyen, entre otros, síndrome metabólico, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, diabetes mellitus (como, por ejemplo, diabetes tipo 2), intolerancia a la glucosa, metabolismo anormal de lípidos, aterosclerosis, hipertensión, patología cardíaca, accidente cerebrovascular, enfermedad del hígado graso no alcohólico, hiperglucemia, esteatosis hepática, dislipidemia, disfunción del sistema inmunitario asociada con sobrepeso y obesidad, enfermedades cardiovasculares, colesterol alto, triglicéridos elevados, asma, apnea del sueño, osteoartritis, neurodegeneración, enfermedad de la vesícula biliar, síndrome X, trastornos inflamatorios e inmunitarios, dislipidemia aterogénica y cáncer.

- 35 En una realización, dicho trastorno metabólico es Diabetes Mellitus, preferiblemente Diabetes de Tipo 2. En otra realización, dicho trastorno metabólico es hipercolesterolemia (también conocida como colesterol alto). En una realización, la hipercolesterolemia corresponde a una concentración de colesterol en plasma superior o igual a 2 g/L o 5 mmol/L. En otra realización, la hipercolesterolemia corresponde a una relación de concentración plasmática de colesterol total: concentración plasmática de HDL (colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad) superior o igual a 4.5: 1, preferiblemente 5: 1.

- 40 Como se usa en este documento, el término "Akkermansia muciniphila pasteurizada" significa Akkermansia muciniphila sometida a calentamiento. En una realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención se calentó a una temperatura de 50 °C a 100 °C, preferiblemente de 60 °C a 95 °C, más preferiblemente de 70 °C a 90 °C. En una realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención se calentó a una temperatura de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 o 59 °C. En otra realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención se calentó a una temperatura de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 o 69 °C. En otra realización más, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención se calentó a una temperatura de 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 o 79 °C. En aún otra realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención se calentó a una temperatura de 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 u 89 °C. En aún otra realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención se calentó a una temperatura de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 °C o 100 °C.

- 50 En una realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención no se calentó a una temperatura superior a 100 °C. En una realización particular, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención no se calentó a una temperatura ultra alta, tal como por ejemplo a una temperatura de 110 °C a 140 °C. En una realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención no se calentó a una temperatura superior a 90 °C. Por consiguiente, en una realización de la invención, Akkermansia muciniphila no se esterilizó. La esterilización es un tratamiento destinado a destruir, matar o inactivar todas las formas de vida y otros agentes biológicos. Esto incluye microorganismos y sus esporas, así como virus y priones. A diferencia de la esterilización, la pasteurización no está destinada a matar todos los microorganismos, pero generalmente se aplica a los alimentos con el objetivo de reducir la cantidad de patógenos viables.

- 60 En una realización de la invención, la Akkermansia muciniphila pasteurizada se calentó durante al menos 10 minutos. En otra realización de la invención, la Akkermansia muciniphila pasteurizada se calentó durante al menos 15, 20, 25, 30, 35 o 45 minutos. En una realización, la Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención se calentó durante un período de 10 a 45 minutos.

65

En una realización, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada no se calentó durante un corto período de tiempo. En una realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada no se calentó durante un tiempo de 1 a 30 segundos, de 1 a 60 segundos, de 1 a 90 segundos o de 1 a 120 segundos. En una realización preferida, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada no se calentó durante un tiempo de menos de 1 minuto, preferiblemente durante un tiempo de menos de 5, 6, 7, 8 o 9 minutos.

En una realización, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada se calentó a una temperatura de 50 °C a 100 °C durante al menos 10 minutos. En una realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada de la invención se calentó a 60 °C durante 20 o 30 minutos. En otra realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada de la invención se calentó a 70 °C durante 20 o 30 minutos. En otra realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada de la invención se calentó a 80 °C durante 20 o 30 minutos. En otra realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada de la invención se calentó a 90 °C durante 20 o 30 minutos.

En una realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada no se calentó a una temperatura superior a 110 °C durante aproximadamente 1 a 120 segundos. En otra realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada no se calentó a una temperatura superior a 100 °C durante aproximadamente 1 a 120 segundos. En otra realización particular, la *Akkermansia muciniphila* pasteurizada no se calentó a una temperatura superior a 90 °C durante aproximadamente 1 a 120 segundos.

De acuerdo con una realización, *Akkermansia muciniphila* pasteurizada de la invención son células no viables. Como se usa en este documento, "células no viables" significa células que no pueden proliferar. La medición de la viabilidad y proliferación celular puede ser cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, la viabilidad y la proliferación celular se pueden evaluar extendiendo una solución que contenga *Akkermansia muciniphila* pasteurizada a través de una placa de Petri o usando cualquier otro método de cultivo y contando el número de clones o la densidad óptica después de un tiempo determinado de incubación en condiciones óptimas de crecimiento. Además, también es posible determinar el número de células, incluidas las células viables así como las no viables, al menos ya que la integridad de las células no se ve comprometida, mediante observación microscópica. Si bien la microscopía de contraste de fase es un método bien conocido para hacerlo, las células microbianas se pueden visualizar adicionalmente mediante tinción específica con tintes, sondas fluorescentes o anticuerpos. Esto permite facilitar las observaciones microscópicas, mientras que el número de células teñidas también se puede contar mediante citometría de flujo. Derrien et al. han proporcionado ejemplos para visualizar o contar células de *Akkermansia muciniphila*. (2008. Appl. Environ. Microbiol. 74: 1646-8), Derrien et al. (2011. Frontiers Microbiol. 2: 166-175) o Reunanen et al. (2015. Appl. Environ. Microbiol. 81 (11): 3655-62).

En una realización, *Akkermansia muciniphila* pasteurizada o un fragmento de la misma se purifica sustancialmente. Como se usa en este documento, el término "sustancialmente purificado" significa que *Akkermansia muciniphila* pasteurizada o un fragmento de la misma está comprendido en una muestra en la que representa al menos aproximadamente el 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 99 % o más de las cepas bacterianas o fragmentos de las mismas de dicha muestra.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de *Akkermansia muciniphila* pasteurizada o un fragmento de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica.

En una realización de la invención, la cantidad eficaz de *Akkermansia muciniphila* pasteurizada corresponde a la cantidad de bacterias suficiente para restaurar una cantidad y/o proporción normal de *Akkermansia muciniphila* en el intestino del sujeto. En una realización de la invención, la cantidad y/o proporción normal de *Akkermansia muciniphila* corresponde a la cantidad y/o la proporción de *Akkermansia muciniphila* presente en el intestino de un sujeto sano.

Como se usa en este documento, el término "sujeto sano" se usa para definir un sujeto que no se ve afectado por la enfermedad que se va a tratar. Por ejemplo, si se usa *Akkermansia muciniphila* pasteurizada o un fragmento de la misma para tratar la obesidad, el sujeto sano no se ve afectado por la obesidad. Preferiblemente, el sujeto sano comparte características comunes con el sujeto a tratar, tales como, por ejemplo, mismo género, edad, sexo, dieta, ingesta de fármacos o geolocalización.

En una realización de la invención, la proporción normal de *Akkermansia muciniphila* en el intestino varía de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 10 % (en número de células de *Akkermansia muciniphila* al número total de células bacterianas del intestino), preferiblemente de aproximadamente 0.3 % a aproximadamente 5 %, más preferiblemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 3 %.

En una realización, la cantidad eficaz de *Akkermansia muciniphila* pasteurizada de la invención corresponde a una cantidad de *Akkermansia muciniphila* antes de la etapa de pasteurización que varía de aproximadamente $1 \cdot 10^2$ a

aproximadamente 1.10^{15} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc, donde ufc significa "unidad formadora de colonias".

- 5 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc.
- 10 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} ufc.
- 15 En una realización, la cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada de la invención varía de aproximadamente $1,10^2$ a aproximadamente $1,10^{15}$ células, preferiblemente de aproximadamente $1,10^4$ a aproximadamente $1,10^{12}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^5$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células, e incluso más preferiblemente de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{12}$ células a aproximadamente 1.10^9 células.
- 20 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada varía de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células, preferiblemente de aproximadamente $1,10^8$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^9$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células.
- 25 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada varía de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células, preferiblemente de aproximadamente $1,10^8$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^{10}$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células.
- 30 En una realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila pasteurizada corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc, donde ufc significa "unidad formadora de colonias".
- 35 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila pasteurizada corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc.
- 40 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila pasteurizada corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{11}$ ufc, preferiblemente de aproximadamente $1,10^8$ a aproximadamente $1,10^{11}$ ufc, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^{10}$ a aproximadamente $1,10^{11}$ ufc.
- 45 En una realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila pasteurizada varía de fragmentos derivados de aproximadamente $1,10^2$ a aproximadamente $1,10^{15}$ células, preferiblemente de aproximadamente $1,10^4$ a aproximadamente $1,10^{12}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^5$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células, e incluso más preferiblemente de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^9$ células.
- 50 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila pasteurizada varía de fragmentos derivados de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células, preferiblemente de aproximadamente $1,10^8$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^9$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células.
- 55 En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila pasteurizada varía de fragmentos derivados de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células, preferiblemente de aproximadamente $1,10^8$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^{10}$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células.
- 60 En una realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de Akkermansia muciniphila pasteurizada que corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/g de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc/g de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g de la composición e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/g de la composición.
- 65

5

10

15

20

25

30

40

45

50

55

65

aproximadamente 1.10^{10} células/g o células/ml de la composición e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 células/g o células/ml de la composición.

En otra realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada que varía desde fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} células/g o células/ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células/g o células/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células/g o células/ml.

En otra realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada que varía desde fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} células/g o células/ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} células/g o células/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} células/g o células/ml.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para tratar un trastorno metabólico, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica. En el presente documento se describe una composición farmacéutica para restaurar una proporción normal de Akkermansia muciniphila o aumentar la abundancia de cualquier compuesto activo de Akkermansia muciniphila en el intestino de un sujeto que lo necesite.

Como se usa en este documento, el término “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente que no produce una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un animal, preferiblemente un ser humano. Puede incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. Para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con esterilidad, pirogenicidad, estándares de seguridad y pureza requeridos por los estándares de la Oficina de Productos Biológicos de la FDA.

La presente invención también se refiere a un medicamento que comprende una cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para tratar un trastorno metabólico, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera, que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia y dislipidemia aterogénica. También se divulga aquí un medicamento para restaurar una proporción normal de Akkermansia muciniphila en el intestino de un sujeto que lo necesite.

La presente divulgación también se refiere a un método para tratar o prevenir un trastorno metabólico en un sujeto que lo necesita, en el que dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma al sujeto.

La presente divulgación también se refiere a un método para restaurar una proporción normal de Akkermansia muciniphila, fragmentos u otros compuestos activos de Akkermansia muciniphila en el intestino de un sujeto que lo necesite, en el que dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma al sujeto.

El método divulgado en el presente documento comprende administrar una cantidad eficaz de la composición, de la composición farmacéutica o del medicamento de la invención al sujeto.

En una realización de la invención, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición, composición farmacéutica o medicamento se administra al menos una vez a la semana, preferiblemente al menos dos veces a la semana, más preferiblemente al menos tres veces a la semana, y incluso más preferiblemente al menos cuatro veces a la semana. En otra realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición, composición farmacéutica o medicamento se administra al menos una vez al día, y preferiblemente al menos dos veces al día.

En una realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención se administra durante 1 semana, preferiblemente durante 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas o más.

En una realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención se administra durante un período que dura hasta que se logra el resultado deseado (por ejemplo, pérdida de peso, tratamiento de trastornos metabólicos, disminución del nivel de colesterol en plasma...).

5 En una realización, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición, composición farmacéutica o medicamento de la invención es permanente, es decir, no está limitada en el tiempo.

10 En una realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/día.

15 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día.

20 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día.

25 En una realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} células/día e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 células/día.

30 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células/día.

35 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} células/día.

40 En una realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/día.

45 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día.

50 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día.

55 En una realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrados por día varía de fragmentos derivados de 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} células/día e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 células/día.

60 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de fragmentos derivados de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células/día.

65

En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrados por día varía de fragmentos derivados de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} células/día.

En una realización de la invención, el sujeto tiene sobrepeso. En otra forma de realización, el sujeto es obeso.

En una realización de la invención, al sujeto se le diagnostica un trastorno metabólico, tal como, por ejemplo, un trastorno metabólico relacionado con el sobrepeso y/o la obesidad. En una realización de la invención, al sujeto se le diagnostica un trastorno metabólico, tal como, por ejemplo, con un peso normal y/o glucosa en ayunas alterada y/o hipertrigliceridemia y/o cualquier trastorno metabólico o factor de riesgo cardiovascular relacionado.

En otra realización, el sujeto tiene riesgo de desarrollar un trastorno metabólico, tal como, por ejemplo, un trastorno metabólico relacionado con el sobrepeso y/o la obesidad. En una realización, dicho riesgo está relacionado con el hecho de que el sujeto tiene sobrepeso o es obeso. En otra realización, dicho riesgo corresponde a una predisposición, tal como, por ejemplo, una predisposición familiar a un trastorno metabólico, tal como, por ejemplo, a un trastorno metabólico relacionado con el sobrepeso y/o la obesidad.

En una realización de la invención, el sujeto presenta una desregulación de la composición de la microbiota intestinal. Preferiblemente, la microbiota intestinal de dicho sujeto está agotada en cepas de Akkermansia muciniphila. En una realización, la proporción de Akkermansia muciniphila en el intestino del sujeto es inferior al 1 %, preferiblemente inferior al 0.5 %, más preferiblemente inferior al 0.1 %, en número de células de Akkermansia muciniphila al número total de células bacterianas en el intestino.

La presente divulgación también se refiere al uso cosmético de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para promover la pérdida de peso en un sujeto.

Por tanto, otro objeto de la divulgación es una composición cosmética que comprende una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, y su uso para promover la pérdida de peso en un sujeto. Como se usa en este documento, una "cantidad cosméticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una composición cosmética necesaria y suficiente para promover un efecto cosmético, tal como, por ejemplo, para inducir la pérdida de peso en un sujeto.

La presente divulgación también se refiere a un método para promover la pérdida de peso en un sujeto que lo necesite, en el que dicho método comprende administrar una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a dicho sujeto.

El método divulgado en el presente documento comprende administrar una cantidad cosméticamente eficaz de la composición o de la composición cosmética de la invención al sujeto.

La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía desde aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc.

La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc.

La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} ufc.

La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento varía de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} células, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} células, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} células e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 células.

La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} células, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células.

La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} células, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} células, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} células.

5 La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc y incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc.

10 La cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en el presente documento corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc.

15 En otra realización de la invención, la cantidad cosméticamente eficaz de fragmentos de Akkermansia muciniphila varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} ufc.

20 La cantidad cosméticamente eficaz de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en este documento varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} células, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} células, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} células e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 células.

25 La cantidad cosméticamente eficaz de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en este documento varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} células, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células.

30 La cantidad cosméticamente eficaz de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada divulgada en este documento varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} células, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} células, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} células.

35 En una realización de la invención, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición se administra al menos una vez a la semana, preferiblemente al menos dos veces a la semana, más preferiblemente al menos tres veces a la semana, e incluso más preferiblemente al menos cuatro veces a la semana.

40 En otra realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición se administra al menos una vez al día, y preferiblemente al menos dos veces al día.

45 En una realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición de la invención se administra durante 1 semana, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas o más.

En una realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma, o la composición de la invención se administra durante un período que dura hasta que se logra el resultado deseado (por ejemplo, pérdida de peso ...).

50 En una realización, la administración de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma, o la composición de la invención es permanente, es decir, no está limitada en el tiempo.

55 En una realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{12} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día.

60 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día.

65 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de 1.10^6 a

aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día.

5 En una realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{12} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células/día.

10 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células/día.

15 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} células/día.

20 En una realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{12} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/día, De 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día.

25 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día.

30 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día corresponde a una cantidad de Akkermansia muciniphila antes de la etapa de pasteurización que varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} ufc/día.

35 En una realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{12} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células/día.

40 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} células/día.

45 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de fragmentos de Akkermansia muciniphila pasteurizada administrada por día varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{11} células/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^{10} a aproximadamente 1.10^{11} células/día.

En una realización, dicho sujeto no es un sujeto obeso. En otra realización, dicho sujeto tiene sobrepeso.

55 En una realización de la invención, la composición, la composición farmacéutica, o el medicamento comprenden además cepas o especies probióticas adicionales, tales como, por ejemplo, cepas o especies probióticas bacterianas; procariotas probióticos distintos de las bacterias; o cepas o especies de hongos, preferiblemente cepas o especies de levadura. En una realización, dichas cepas o especies probióticas adicionales se seleccionan de aquellas presentes naturalmente en el intestino del sujeto, preferiblemente en el intestino humano, más preferiblemente en el intestino de sujetos humanos sanos.

60 Ejemplos de cepas o especies probióticas bacterianas que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Lactobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium, Veillonella, Desemzia, Christensenella, Allobaculum, Coprococcus, Collinsella, Citrobacter, Turicibacter, Sutterella, Subdoligranulum, Streptococcus, Sporobacter, Sporacetigenium, Ruminococcus, Roseburia, Proteus, Propionobacterium, Leuconostoc, Weissella, Pediococcus, Streptococcus, Prevotella, Parabacteroides, Papillibacter, Oscillospira, Melissococcus, Dorea, Dialister, Clostridium, Cedecea, Catenibacterium, Butyrivibrio, Butiauxella, Bulleidia, Bilophila, Bacteroides, Anaerovorax,

Anaerostopes, Anaerofilum, Enterobacteriaceae, Firmicutes, Atopobium, Alistipes, Acinetobacter, Slackie, Shigella, Shewanella, Serratia, Mahella, Lachnospira, Klebsiella, Idiomarina, Fusobacterium, Faecalibacterium, Eubacterium, Enterococcus, Enterobacter, Eggerthella.

En una realización particular, dichas cepas o especies probióticas bacterianas se seleccionan de la lista que comprende Bifidobacterium and Lactobacillus. En una realización, las cepas o especies probióticas de Bifidobacterium se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende Bifidobacterium animalis, más preferiblemente Bifidobacterium animalis spp. lactis, y Bifidobacterium lactis. En una realización, las cepas o especies probióticas de Lactobacillus se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei y Lactobacillus acidophilus.

Ejemplos de cepas o especies procariotas que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Archaea, Firmicutes, Verrucomicrobia, Christensenella, Bacteroidetes (tales como, por ejemplo, Allistipes, Bacteroides ovatus, Bacteroides splachnicus, Bacteroides stercoris, Parabacteroides, Prevotella ruminicola, Porphyromonadaceae y géneros relacionados), Proteobacteria, Betaproteobacteria (como, por ejemplo, Aquabacterium y Burkholderia), Gammaproteobacteria (como, por ejemplo, Xanthomonadaceae), Actinobacteria (como, por ejemplo, Actinomycetaceae y Atopobium), Methanobacteria, Spirochaetes, Fibrobacters, 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 (como, por ejemplo, Lactobacillus salivarius y especies relacionadas, Aerococcus, Granulicatella, Streptococcus bovis y géneros relacionados y Streptococcus intermedius y géneros relacionados), Clostridium (como, por ejemplo, Eubacterium hallii, Eubacterium limosum y géneros relacionados) y Butyrivibrio.

Los ejemplos de cepas o especies probióticas fúngicas, preferiblemente cepas o especies probióticas de levadura que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a Ascomycetes, Zygomycetes y Deuteromycetes, preferiblemente de los grupos Aspergillus, Torulopsis, Zygosaccharomyces, Hansenula, Candida, Saccharomyces, Clavispora, Bretanomyces, Pichia, Amylomyces, Zygosaccharomyces, Endomyces, Hyphopichia, Zygosaccharomyces, Kluyveromyces, Mucor, Rhizopus, Yarrowia, Endomyces, Debaryomyces, y/o Penicillium.

En una realización de la invención, la composición, la composición farmacéutica, la composición cosmética o el medicamento no comprende las cepas bacterianas Lactobacillus-Enterococcus, Bacteroides y/o Atopobium.

En una realización de la invención, la única cepa o especie microbiana, preferiblemente cepa o especie bacteriana, comprendida en la composición, composición farmacéutica, o medicamento es Akkermansia muciniphila.

En una realización de la invención, la composición, composición farmacéutica, composición cosmética o medicamento consiste en Akkermansia muciniphila pasteurizada.

En otra realización de la invención, la composición, composición farmacéutica, composición cosmética o medicamento consiste esencialmente en Akkermansia muciniphila pasteurizada, en la que “que consiste esencialmente en” aquí significa que Akkermansia muciniphila es la única cepa o especie microbiana, preferiblemente la única cepa bacteriana o especies comprendidas en la composición, composición farmacéutica, o medicamento.

En una realización de la invención, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma activa o inhibe el crecimiento y/o la actividad biológica de otras cepas bacterianas o especies de la microbiota intestinal.

En una realización de la invención, la composición, la composición farmacéutica, o el medicamento comprenden además un prebiótico.

Los ejemplos de prebióticos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, inulina y fructanos de tipo inulina, oligofructosa, beta-glucanos, xilosa, arabinosa, arabinosilano, ribosa, galactosa, ramnosa, celobiosa, fructosa, lactosa, salicina, sacarosa, glucosa, esculina, tween 80, trehalosa, maltosa, manosa, melibiosa, moco o mucinas, rafinosa, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, aminoácidos, alcoholes, carbohidratos fermentables y cualquier combinación de los mismos.

Otros ejemplos no limitantes de prebióticos incluyen derivados de celulosa solubles en agua, derivados de celulosa insolubles en agua, harina de avena sin procesar, metamucil, todo salvado y cualquier combinación de los mismos.

Los ejemplos de derivados de celulosa solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, metiletilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa catiónica, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa.

Akkermansia muciniphila fermentada o un fragmento de la misma o la composición, composición farmacéutica, o medicamento de la invención pueden administrarse mediante varias vías de administración. Los ejemplos de vías de administración adaptadas incluyen, pero no se limitan a, administración oral, administración rectal, administración vía

esofagogastroduodenoscopia, administración vía colonoscopia, administración usando una sonda nasogástrica u orogástrica y similares.

De acuerdo con una realización, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma o la composición, composición farmacéutica, o medicamento de la invención se encuentra en una forma adaptada a la administración oral. De acuerdo con una primera realización, la forma adaptada a la administración oral es una forma sólida seleccionada del grupo que comprende comprimidos, píldoras, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, píldoras recubiertas de azúcar, comprimidos orodispersantes, comprimidos efervescentes u otros sólidos. De acuerdo con una segunda realización, la forma adaptada a la administración oral es una forma líquida, tal como, por ejemplo, una solución bebible, formas liposomales y similares.

En una realización, la composición, composición farmacéutica, o medicamento de la invención comprende además excipientes, diluyentes y/o portadores seleccionados con respecto a la vía de administración pretendida. Ejemplos de excipientes, diluyentes y/o portadores incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina tampón fosfato, solución 15 tampón fosfato anaeróbico, bicarbonato sódico, jugo, leche, yogur, fórmula infantil, producto lácteo, agentes colorantes, tales como, para ejemplo, dióxido de titanio (E171), dióxido de hierro (E172) y BN negro brillante (E151); agentes aromatizantes; espesantes como, por ejemplo, monoestearato de glicerol; edulcorantes; agentes de revestimiento, como por ejemplo aceite de colza refinado, aceite de soja, aceite de cacahuate, lecitina de soja o gelatina de pescado; agentes diluyentes como, por ejemplo, lactosa, lactosa monohidratada o almidón; agentes 20 aglutinantes como, por ejemplo, povidona, almidón pregelatinizado, gomas, sacarosa, polietilenglicol (PEG) 4000 o PEG 6000; agentes disgregantes, tales como, por ejemplo, celulosa microcristalina o carboximetil almidón de sodio, tales como, por ejemplo, carboximetil almidón de sodio tipo A; agentes lubricantes como, por ejemplo, estearato de magnesio; agente de flujo, como, por ejemplo, sílice coloidal anhidra, etc.

En una realización de la invención, la composición, composición farmacéutica, o medicamento está en forma de composición nutricional, es decir, comprende alimento líquido o sólido, pienso o agua potable. En una realización de la invención, la composición, composición farmacéutica, composición cosmética o medicamento es un producto alimenticio, tal como, por ejemplo, productos lácteos, bebidas lácteas, yogur, zumos de frutas o verduras o concentrados de los mismos, polvos, malta o soja o bebidas a base de cereales, cereales para el desayuno como 30 muesli en hojuelas, zumos de frutas y verduras en polvo, cereales y/o barras de chocolate, productos de confitería, pastas para untar, harinas, leche, batidos, productos de confitería, productos lácteos, leche en polvo, leche reconstituida, leche cultivada, yogur, bebida de yogur, yogur preparado, bebida, bebida láctea, bebida láctea, chocolate, geles, helados, cereales, productos de frutas reconstituidos, barras de bocadillos, barras de alimentos, barras de muesli, pastas para untar, salsas, salsas de untar, productos lácteos, incluidos yogures y quesos, bebidas 35 incluidas las bebidas lácteas y no lácteas, los suplementos deportivos, incluidos los suplementos deportivos lácteos y no lácteos.

En una realización de la invención, la composición, composición farmacéutica, o medicamento está en forma de aditivo alimentario, aditivo de bebida, suplemento dietético, producto nutricional, alimento médico o composición nutracéutica.

Se sabe que la obesidad y los trastornos relacionados están asociados con una mayor permeabilidad intestinal y con una producción de moco alterada, barrera epitelial, sistema inmunitario y/o producción de compuestos antibacterianos por parte del sujeto; y los Solicitantes sugieren que la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada puede restaurar estos parámetros.

Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para disminuir la permeabilidad intestinal y/o restaurar la producción alterada de moco y/o restaurar la barrera del epitelio y/o restaurar el sistema inmunitario y/o restaurar la producción de compuestos antibacterianos. Otro objeto 50 divulgado en este documento es un método para disminuir la permeabilidad intestinal y/o restaurar la producción de moco alterada y/o restaurar la barrera del epitelio y/o restaurar el sistema inmunitario y/o disminuir la producción de compuestos antibacterianos en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz o cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

Por lo tanto, otro objeto divulgado en este documento es una Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para controlar la función de barrera intestinal, y a un método para controlar la función de barrera intestinal que comprende administrar una cantidad efectiva o cosméticamente efectiva de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento del mismo a un sujeto que lo necesite. Como se divulga en este documento, Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma regula el grosor de la capa de moco (que puede disminuir en la obesidad u otros trastornos metabólicos). Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma induce la producción de péptidos antimicrobianos de colon, tales como, por 60 ejemplo, RegIIIgamma. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma induce la producción de compuestos de la familia de los endocannabinoides, tales como, por ejemplo, acilglicerol seleccionados del grupo que comprende 2-oleoilglicerol, 2-palmitoilglicerol y 2-araquidonoilglicerol. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma regula el recambio de moco.

Otro objeto de la divulgación se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para su uso en el tratamiento de la disfunción metabólica asociada con o causada por un trastorno metabólico. Otro objeto más de la divulgación es, por tanto, un método para tratar la disfunción metabólica asociada con o causada por un trastorno metabólico en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz o una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto en necesidad del mismo.

El Solicitante también mostró que la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada controla el almacenamiento de grasa y el metabolismo del tejido adiposo. Por tanto, otro objeto de la divulgación se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para su uso en el control del almacenamiento de grasa y el metabolismo del tejido adiposo. Otro objeto de la divulgación es también un método para controlar el almacenamiento de grasa y el metabolismo del tejido adiposo que comprende administrar una cantidad eficaz o una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite. Como se divulga en este documento, dicho control no implica ningún cambio en la ingesta de alimentos. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma suprime la endotoxemia metabólica. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma reduce la masa grasa. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma aumenta la expresión de ARNm de marcadores de la diferenciación de adipocitos y la oxidación de lípidos, preferiblemente sin afectar la lipogénesis.

La presente divulgación se refiere también a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para uso en la regulación del metabolismo del tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa; ya un método para regular el metabolismo del tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa que comprende administrar una cantidad eficaz o una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma revierte la hiperglucemia en ayunas inducida por la dieta. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma induce una reducción de al menos 10 %, preferiblemente de al menos 30 %, más preferiblemente de al menos 40 % de la expresión de glucosa-6-fosfatasa hepática. Como se divulga en este documento, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma induce una reducción del índice de resistencia a la insulina. Como se divulga en este documento, dicha reducción del índice de resistencia a la insulina es de al menos 5 %, preferiblemente de al menos 10 %, más preferiblemente de al menos 15 %, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50%.

El Solicitante demostró que la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada disminuye la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para disminuir la intolerancia a la glucosa y/o la resistencia a la insulina; ya un método para disminuir la intolerancia a la glucosa y/o la resistencia a la insulina que comprende administrar una cantidad eficaz o una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

La presente divulgación también se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para el tratamiento de la inflamación, preferiblemente inflamación de bajo grado, asociada con o causada por trastornos metabólicos; ya un método para tratar la inflamación relacionada con trastornos metabólicos que comprende administrar una cantidad eficaz o una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

El Solicitante mostró que la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada reduce los niveles de triglicéridos en ratones tratados. Por tanto, la presente divulgación también se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para reducir los niveles de triglicéridos en plasma; y a un método para disminuir los niveles de triglicéridos en plasma que comprende administrar una cantidad eficaz o una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

La presente divulgación también se refiere a Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma para disminuir el colesterol plasmático; y a un método para disminuir el colesterol plasmático que comprende administrar una cantidad eficaz o una cantidad cosméticamente eficaz de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

En una realización de la invención, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto no tiene impacto en la ingesta de alimentos de dicho sujeto.

En una realización de la invención, la administración de Akkermansia muciniphila pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto aumenta el gasto energético de dicho sujeto, preferiblemente sin afectar la ingesta de alimentos de dicho sujeto.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere a un método para aumentar el gasto energético de un sujeto, que comprende administrar *Akkermansia muciniphila* pasteurizada o un fragmento de la misma, o una composición, composición farmacéutica, composición cosmética o medicamento de la invención al sujeto, preferiblemente en una cantidad terapéutica o cosméticamente eficaz. Preferiblemente, el método divulgado en este documento no comprende o comprende además modular la ingesta de alimentos de dicho sujeto. El método divulgado en este documento aumenta el gasto de energía, induciendo así una pérdida de peso duradera en el sujeto y, por lo tanto, tratando trastornos metabólicos en dicho sujeto, tales como, por ejemplo, trastornos metabólicos relacionados con la obesidad.

La administración de *Akkermansia muciniphila* pasteurizada o un fragmento de la misma a un sujeto divulgado en este documento aumenta la saciedad en dicho sujeto. En consecuencia, el método divulgado en este documento aumenta la saciedad en un sujeto, induciendo así una pérdida de peso duradera en el sujeto y, por tanto, tratando trastornos metabólicos en dicho sujeto, tales como, por ejemplo, trastornos metabólicos relacionados con la obesidad.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un conjunto de histogramas que muestran que *Akkermansia muciniphila* cultivada en un medio a base de moco o en un medio de crecimiento sin moco contrarresta el aumento de peso corporal y el aumento de masa grasa en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. Además, los efectos de *A. muciniphila* pasteurizada sobre el aumento de peso corporal y el aumento de masa grasa son más fuertes que con la bacteria viva. (a) Aumento de peso corporal total (g) en ratones alimentados con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y tratados diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contiene glicerol o ratones alimentados con una dieta rica en grasas y tratado diariamente por sonda oral con *A. muciniphila* viva cultivada en un medio a base de moco (HFD Akk M), un medio sin moco (HFD Akk G), o *A. muciniphila* cultivada en un medio a base de moco y pasteurizada (HFD Akk P) durante 4 semanas ($n = 8-10$). (2.10^8 células bacterianas suspendidas en 150 μ L de PBS anaeróbico estéril). (b) Ganancia total de masa grasa (g) medida por resonancia magnética nuclear en el dominio del tiempo ($n = 8-10$). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 2 es un histograma que muestra la normalización del índice de adiposidad de ratones alimentados con una dieta rica en grasas después del tratamiento con *A. muciniphila*. El índice de adiposidad (g) se muestra como la suma del peso de los depósitos adiposos epididimarios, subcutáneos y mesentéricos ($n = 8-10$). Los datos se muestran como media \pm SEM. * corresponde a un valor de $P < 0,05$ cuando se compararon dos condiciones con una prueba t de Student de dos colas no apareada.

La Figura 3 es un conjunto de gráficos que muestran una disminución de la intolerancia a la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasas después de la administración de *A. muciniphila* pasteurizada en mayor medida que la administración de *A. muciniphila* viva cultivada bien sea en un medio a base de moco o base sin moco (a) Perfil de glucosa en plasma después de la exposición oral a 2 g/kg de glucosa en ratones que se mueven libremente ($n = 8-10$). (b) Área media bajo la curva (AUC) medida entre -30 y 120 min después de la carga de glucosa ($n = 8-10$). (c) Índice de resistencia a la insulina, determinado multiplicando el AUC de la glucosa plasmática (-30 a 120 min) por el AUC de la insulina plasmática (-30 a 15 min) ($n = 8-10$). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 4 es un histograma que muestra la modulación de la expresión de marcadores de integridad intestinal y corrige la endotoxemia metabólica inducida por HFD después de la administración de *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco y viva o pasteurizada. (a) expresión de ARNm de *Ocln*, *Cldn3* y *Lyzl* en el yeyuno ($n = 7-10$), (b) expresión de ARNm de *Ocln*, *Cldn3* y *Lyzl* en el íleon ($n = 7-10$), (c) Niveles de lipopolisacáridos en plasma (UE/ml) ($n = 5-9$). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 5 es un conjunto de histogramas que muestran una reducción de la ganancia de peso corporal y la ganancia de masa grasa después de la administración de *A. muciniphila* pasteurizada en mayor medida que *A. muciniphila* viva cultivada en un medio sin moco. (a) Aumento de peso corporal total (g) en ratones alimentados con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y tratados diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contiene glicerol o ratones alimentados con una dieta rica en grasas y tratados diariamente por sonda oral con *A. muciniphila* viva cultivada en un medio sin moco (HFD Akk G), o *A. muciniphila* cultivada en un medio a base de moco y pasteurizada (HFD Akk P) ($n = 16-19$) durante 5 semanas. (2.10^8 células bacterianas suspendidas en 150 μ L de PBS anaeróbico estéril). (b) Ganancia total de masa grasa (g) medida por resonancia magnética nuclear en el dominio del tiempo ($n = 16-19$). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 6 es un histograma que muestra una reducción del índice de adiposidad después de la administración de *A. muciniphila* pasteurizada en mayor medida que *A. muciniphila* viva cultivada en un medio sin moco. Índice de adiposidad (g), mostrado como el peso combinado de los depósitos adiposos epididimario, subcutáneo y mesentérico (n = 16-19). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 7 es un conjunto de histogramas que muestran que la administración de *A. muciniphila* pasteurizada contrarresta la intolerancia a la glucosa en ratones alimentados con una dieta rica en grasas en mayor medida que *A. muciniphila* viva. Los ratones se alimentaron con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y se trataron diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contenía glicerol o *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco, ya sea en vivo (HFD Akk G), o pasteurizado (HFD Akk P) durante 5 semanas. (a) Perfil de glucosa en plasma después de la exposición oral a 2 g/kg de glucosa en ratones que se mueven libremente (n = 8-10). Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni. (b) Área media bajo la curva (AUC) medida entre -30 y 120 min después de la carga de glucosa (n = 10). (c) Índice de resistencia a la insulina, determinado multiplicando el AUC de la glucosa plasmática (-30 a 120 min) por el AUC de la insulina plasmática (-30 a 15 min) (n = 8-10). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 8 es un conjunto de gráficos que muestran que la administración de *A. muciniphila* viva o pasteurizada contrarresta la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. (a) Perfil de glucosa en plasma después de la exposición oral a 2 g/kg de glucosa en ratones que se mueven libremente (n = 8-10). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni. (b) Área media bajo la curva (AUC) medida entre -30 y 120 min después de la carga de glucosa (n = 8-10). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. (c) Relación del control (-) y del p-IR β estimulado con insulina (+) en el control de carga medida por densitometría. (d) Relación del control y p-Akt^{thr308} estimulado con insulina sobre el control de carga medida por densitometría. (e) Relación del control y p-Akt^{ser473} estimulado con insulina sobre el control de carga medida por densitometría. (c-e) n = 3-5. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni.

La Figura 9 es una fotografía (a) y un histograma (b) que muestran que la administración de *A. muciniphila* pasteurizada contrarresta los efectos de una dieta rica en grasas sobre el diámetro medio de los adipocitos. Los ratones se alimentaron con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y se trataron diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contenía glicerol o *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco, ya sea en vivo (HFD Akk G), o pasteurizado (HFD Akk P) durante 5 semanas. (a) Imagen teñida con hematoxilina y eosina representativa de depósitos de tejido adiposo subcutáneo. Barra de escala: 100 μ m. (b) Diámetro medio de los adipocitos (μ m) determinado por análisis histológico (n = 16-19). (c) Niveles plasmáticos de leptina medidos en la vena porta (pg/ml) (n = 8-10). Los datos se muestran como media \pm SEM. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 10 es un histograma que muestra la reducción de los niveles de triglicéridos en plasma después de la administración de *A. muciniphila* pasteurizada. Los ratones se alimentaron con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y se trataron diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contenía glicerol o *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco, ya sea en vivo (HFD Akk G), o pasteurizado (HFD Akk P) durante 5 semanas (n = 16-19). Los datos se muestran como media \pm SEM. El valor de p se indica cuando se compararon dos condiciones con una prueba t de Student de dos colas no apareada (*: P <0,05).

La Figura 11 es un histograma que muestra que la administración de *A. muciniphila* viva o pasteurizada disminuye significativamente el colesterol HDL en suero y conduce a una tendencia similar para el colesterol LDL. Niveles de colesterol VLDL, LDL y HDL en plasma determinados por cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC). Los ratones se alimentaron con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y se trataron diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contenía glicerol o *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco, ya sea en vivo (HFD Akk G), o pasteurizado (HFD Akk P) durante 5 semanas (n = 8-10). Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P <0.05), de acuerdo con el análisis ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni.

La Figura 12 es un histograma que muestra que la administración de *A. muciniphila* pasteurizada aumenta la energía excretada en las heces. Energía fecal medida por calorimetría de bomba indirecta (kcal/g heces) (n = 5). Los ratones se alimentaron con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y se trataron diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contenía glicerol o *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco, ya sea en vivo (HFD Akk G), o pasteurizado (HFD Akk P) durante 5 semanas. Los datos se muestran como media \pm SEM.

Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

La Figura 13 es un gráfico que muestra que la administración de *A. muciniphila* pasteurizada induce una mayor corrección del desplazamiento inducido por HFD en el perfil de metabolómica urinaria del huésped que *A. muciniphila* viva. (a) Gráficos de puntuación del análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales parciales (OPLS-DA) para los perfiles metabólicos de la orina ($n = 5-7$). (b) Impacto de todos los tratamientos en el componente predictivo 1 del análisis OPLS-DA. Los ratones se alimentaron con una dieta de control (CT ND), una dieta alta en grasas (CT HFD) y se trataron diariamente por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contenía glicerol o *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco, ya sea en vivo (HFD Akk G), o pasteurizado (HFD Akk P) durante 5 semanas.

La Figura 14 es un conjunto de gráficos que muestran la evaluación de seguridad de *A. muciniphila* después de la administración oral en pacientes con sobrepeso/obesidad ($n = 5$). (A-C) Marcadores relacionados con la inflamación y la hematología: (A) Proteína reactiva a C (mg/dl), (B) Recuento total de glóbulos blancos (10^3 células/ μ L), (C) Tiempo de protrombina (seg). (D-F) Marcadores relacionados con la función renal: (D) Urea (mg/dl), (E) Creatinina (mg/dl), (F) Tasa de filtración glomerular ($\text{ml/min} \times 1.73\text{m}^2$). (G-I) Marcadores relacionados con la función hepática: (G) Actividad alanina transaminasa (IU/l), (H) Actividad aspartato transaminasa (IU/l), (I) Actividad γ -glutamyltranspeptidasa (IU/l). (J-K) Marcadores relacionados con la función muscular: (J) Actividad de creatinina quinasa (IU/l), (K) Actividad de lactato deshidrogenasa (IU/l).

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Anteriormente se mostró que la administración diaria de *Akkermansia muciniphila* a ratones alimentados con una dieta alta en grasas puede impedir el desarrollo de la obesidad (WO 2014/076246).

Con la perspectiva de transferir estos resultados a entornos clínicos, se decidió evaluar si *A. muciniphila* conservaría sus efectos cuando se cultivase en un medio sin moco adecuado para ensayos en humanos. Además, los resultados anteriores indicaron que el autoclave de *A. muciniphila* abolió su efecto sobre la obesidad inducida por la dieta. Por lo tanto, se buscó investigar las consecuencias de otro método de inactivación (es decir, pasteurización) sobre los efectos mediados por *A. muciniphila*.

Materiales y métodos

Ratones

Primer experimento: un conjunto de ratones C57BL/6J de 10 semanas de edad (50 ratones, $n = 10/\text{grupo}$) (Charles River, L'Arbresle, Francia) se alojaron en un entorno controlado (ciclo de luz diurna de 12 h, luces apagadas a las 6 h. pm) en grupos de dos ratones por jaula, con libre acceso a comida y agua. Los ratones fueron alimentados con una dieta de control (ND) (AIN93Mi, Research diet, New Brunswick, NJ, EE. UU.) o una dieta alta en grasas (HFD) (60% de grasa y 20% de carbohidratos (kcal/100 g) D12492i, Research diet, New Brunswick, Nueva Jersey, EE. UU.).

Los ratones fueron tratados diariamente con una administración oral de *Akkermansia muciniphila* cultivada en un medio a base de mucina (HFD Akk M) o un medio sin moco (HFD Akk G) por sonda oral a la dosis de 2.10^8 ufc/0.15 ml suspendido en solución salina regulada con fosfato anaeróbica estéril (PBS). Además, un grupo de ratones se trató diariamente con una administración oral de *Akkermansia muciniphila* cultivada en un medio sin moco e inactivada por pasteurización (HFD Akk P). Los grupos de control se trataron con una sonda oral de un volumen equivalente de PBS anaeróbico estéril (CT ND y CT HFD) que contenía una concentración final similar de glicerol (2,5% vol/vol). El tratamiento continuó durante 4 semanas.

Para el grupo HFD Akk M, *A. muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) se cultivó anaeróticamente en un medio basal basado en mucina como se describió anteriormente (Derrien et al., 2004. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1469-1476). A continuación, los cultivos se lavaron y suspendieron en PBS anaeróbico, que incluía glicerol al 25% (v/v), hasta una concentración final de $1,10^{10}$ ufc/ml.

Para el grupo HFD Akk G, *A. muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) se cultivó anaeróticamente en un medio sin moco. A continuación, los cultivos se lavaron y suspendieron en PBS anaeróbico, que incluía glicerol al 25% (v/v), hasta una concentración final de $1,10^{10}$ ufc/ml.

Para el grupo HFD Akk P, *A. muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) se cultivó anaeróticamente en un medio sin moco. Los cultivos se lavaron y suspendieron en PBS anaeróbico, que incluía glicerol al 25% (v/v), hasta una concentración final de $1,10^{10}$ ufc/ml. A continuación, los viales se pasteurizaron mediante exposición a una temperatura de 70°C durante 30 minutos en un baño de agua.

Se registró una vez a la semana el peso corporal, la ingesta de alimentos y de agua. La composición corporal se evaluó mediante resonancia magnética nuclear en el dominio del tiempo (TD-NMR) de 7,5 MHz (LF50 minispec, Bruker, Rheinstetten, Alemania).

5 Segundo experimento: un conjunto de ratones C57BL/6J de 10 semanas de edad (40 ratones, $n = 10/\text{grupo}$) (Charles River, L'Arbresle, Francia) se alojaron en un ambiente controlado (ciclo de luz diurna de 12 h, luces apagadas a las 6 h). pm) en grupos de dos ratones por jaula, con libre acceso a comida y agua. Los ratones fueron alimentados con una dieta de control (ND) (AIN93Mi; dieta de investigación, New Brunswick, NJ, EE. UU.) o una dieta alta en grasas (HFD) (60% de grasa y 20% de carbohidratos (kcal/100 g), dieta de investigación D12492i, New Brunswick, Nueva Jersey, EE. UU.). Los ratones se trataron diariamente con una administración oral de *Akkermansia muciniphila* cultivada en un medio sin moco y vivos o pasteurizados (HFD Akk G y HFD Akk P) por sonda oral a la dosis de $2 \cdot 10^8$ ufc/0.15 ml suspendidos en anaerobios estériles. solución salina regulada con fosfato. Los grupos de control se trataron con una sonda oral de un volumen equivalente de solución salina regulada con fosfato anaeróbico estéril (CT ND y CT HFD). El tratamiento continuó durante 5 semanas.

15 Para el grupo HFD Akk G, *A. muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) se cultivó anaeróticamente en un medio sin moco. A continuación, los cultivos se lavaron y suspendieron en PBS anaeróbico, que incluía glicerol al 25% (v/v), hasta una concentración final de $1 \cdot 10^{10}$ ufc/ml.

20 Para el grupo HFD Akk P, *A. muciniphila* MucT (ATTC BAA-835) se cultivó anaeróticamente en un medio sin moco. A continuación, los cultivos se lavaron y suspendieron en PBS anaeróbico, que incluía glicerol al 25% (v/v), hasta una concentración final de $1 \cdot 10^{10}$ ufc/ml. A continuación, los viales se pasteurizaron mediante exposición a una temperatura de 70 °C durante 30 minutos en un baño de agua.

25 Se registró una vez a la semana el peso corporal, la ingesta de alimentos y de agua. La composición corporal se evaluó mediante resonancia magnética nuclear en el dominio del tiempo (TD-NMR) de 7,5 MHz (LF50 minispec, Bruker, Rheinstetten, Alemania).

30 Se recolectaron muestras de orina fresca durante la última semana de tratamiento y se almacenaron directamente a -80 °C antes del análisis. El contenido de energía fecal se midió en muestras fecales recolectadas después de un período de 24 horas durante la última semana de tratamiento mediante el uso de un calorímetro de bomba (Mouse Clinical Institute, 67404 Illkirch, Francia).

35 Tercer experimento: un conjunto de ratones C57BL/6J de 10 semanas de edad (40 ratones, $n = 10/\text{grupo}$) (Charles River, L'Arbresle, Francia) se alojaron en un entorno controlado (ciclo de 12 horas de luz diurna, luces apagadas a las 6 horas). pm) en grupos de dos ratones por jaula, con libre acceso a comida y agua. Los ratones fueron alimentados con una dieta de control (CT ND) (AIN93Mi; Research diet, New Brunswick, NJ, EE. UU.) o una dieta alta en grasas (CT HFD) (60% de grasa y 20% de carbohidratos (kcal/100 g), dieta de investigación D12492i, New Brunswick, Nueva Jersey, EE. UU.). Los ratones fueron tratados diariamente con una administración oral de *Akkermansia muciniphila* cultivada en un medio sin moco y vivos o pasteurizados (HFD Akk G y HFD Akk P) por sonda oral a la dosis de $2 \cdot 10^8$ UFC/0.15 ml suspendidos en solución salina regulada con fosfato anaeróbico estéril. Los grupos de control se trataron con una sonda oral de un volumen equivalente de solución salina regulada con fosfato anaeróbico estéril (CT ND y CT HFD). El tratamiento continuó durante 5 semanas.

45 Todos los experimentos con ratones fueron aprobados y realizados de acuerdo con las directrices del comité de ética local. Las condiciones de alojamiento fueron especificadas por la Ley belga del 29 de mayo de 2013, relativa a la protección de los animales de laboratorio (número de acuerdo LA1230314).

50 Prueba oral de tolerancia a la glucosa

Se trataron ratones en ayunas de 6 h con una carga de glucosa por sonda oral (2 g de glucosa por kg de peso corporal). Los niveles de glucosa en sangre se midieron antes de la carga de glucosa oral y 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la carga de glucosa oral. La glucosa en sangre se determinó con un medidor de glucosa (Accu Check, Aviva, Roche) en muestras de sangre recogidas de la punta de la vena de la cola.

55 Índice de resistencia a la insulina

La concentración de insulina en plasma se determinó en 5 µl de plasma usando un kit ELISA (Mercodia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El índice de resistencia a la insulina se determinó multiplicando el área bajo la curva de glucosa en sangre (-30 a 120 minutos) e insulina plasmática (-30 y 15 minutos) obtenida después de la prueba de tolerancia oral a la glucosa.

Transferencia Western

65 Para analizar la vía de señalización de la insulina en el tercer experimento, los ratones se asignaron a un subgrupo inyectado con solución salina o un subgrupo inyectado con insulina de modo que ambos subgrupos coincidieran en

términos de peso corporal y masa grasa. Luego recibieron 1 mU/g de insulina (Actrapid; Novo Nordisk A/S, Dinamarca) bajo anestesia (isoflurano, Forene, Abbott, Queenborough, Kent, Inglaterra) o un volumen igual de solución salina en la vena porta. Tres minutos después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se extrajo rápidamente el hígado.

Para la detección de proteínas de la vía de la insulina, los tejidos se homogeneizaron en regulador ERK (Triton X-100 0,1%, HEPES 50 mM, NaCl 5 M, Glicerol 10%, MgCl₂ 1,5 mM y DTT 1 mM) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa e inhibidores de la fosfatasa. Se separaron cantidades iguales de proteínas mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos diluidos en solución salina regulada con Tris Tween-20 que contenía leche en polvo desnatada al 1%: p-IRb (1:1,000; sc-25103, Santa Cruz, CA, EE. UU.), P- AktThr308 (1:1,000; # 2965L, Cell Signalling, Danvers, MA, EE. UU.) Y p-AktSer473 (1:1,000; # 4060L, Cell Signalling). La cuantificación de las fosfoproteínas se realizó en 5 animales con inyección de insulina y 5 animales con inyección de solución salina por grupo. El control de carga fue β -actina (1:10000; ab6276).

Muestreo de tejidos

Los animales se anestesiaron con isoflurano (Forene®, Abbott, Queenborough, Kent, Inglaterra) y se tomaron muestras de sangre de las venas porta y cava. A continuación, se sacrificó a los ratones mediante dislocación cervical antes de proceder a la toma de muestras de tejido. Los depósitos adiposos (epididimario, subcutáneo y mesentérico) se disecaron y pesaron con precisión; la suma de los pesos de los tres depósitos de tejido adiposo corresponde al índice de adiposidad. Los segmentos intestinales (íleon, ciego y colon), el contenido cecal y los depósitos de tejido adiposo se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

Análisis histológicos

Los tejidos adiposos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego, las muestras se sumergieron en etanol al 100% durante 24 horas antes de procesarlas para su inclusión en parafina. Las muestras de tejido, secciones en parafina de 5 μ m, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las imágenes se obtuvieron utilizando el escáner de portaobjetos SCN400 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Se seleccionaron al azar 5 campos de gran aumento para cada ratón y se determinó el diámetro de los adipocitos usando ImageJ (Versión 1.50a, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Maryland, EE. UU.).

Preparación de ARN y análisis de qPCR en tiempo real

Se preparó ARN total a partir de tejidos usando reactivo TriPure (Roche). El análisis de cuantificación y de integridad del ARN total se realizó procesando 1 μ l de cada muestra en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent). Se preparó ADNc mediante transcripción inversa de 1 μ g de ARN total usando un kit del sistema de transcripción inversa (Promega, Leiden, Países Bajos). Las PCR en tiempo real se realizaron con el software y el sistema de PCR en tiempo real Biorad CFX (Biorad, Hercules, Estados Unidos) utilizando Mesa Fast qPCR (Eurogentec, Seraing, Bélgica) para la detección de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se eligió RPL19 como gen de mantenimiento. Todas las muestras se procesaron por duplicado en una única placa de reacción de 96 pocillos y los datos se analizaron de acuerdo con el método $2^{-\Delta CT}$. La identidad y pureza del producto amplificado se comprobó mediante el análisis de la curva de fusión realizado al final de la amplificación. Las secuencias de cebadores para los genes de ratón diana se presentan en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Secuencias de cebadores para los genes de ratón diana.

Cebadores		Secuencia
RPL-19	Directo	GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA (SEQ ID NO: 1)
	Inverso	CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT (SEQ ID NO: 2)
Ocln	Directo	ATGTCCGGCCGATGCTCTC (SEQ ID NO: 3)
	Inverso	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT (SEQ ID NO: 4)
Cldn3	Directo	TCATCGGCAGCAGCATCATCAC (SEQ ID NO: 5)
	Inverso	ACGATGGTGATCTTGGCCTTGG (SEQ ID NO: 6)
Lyz1	Directo	GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG (SEQ ID NO: 7)
	Inverso	CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG (SEQ ID NO: 8)

Medición de triglicéridos plasmáticos

Las muestras de plasma se analizaron para determinar los triglicéridos midiendo el glicerol resultante de la hidrólisis de los triglicéridos, utilizando un kit comercial (DiaSys, Condom, Francia).

Medición de leptina plasmática

- 5 Las muestras de plasma se analizaron para detectar leptina mediante el uso de un kit de inmunoensayo multiplex (Merck Millipore, Bruselas, Bélgica) y se midieron usando tecnología Luminex (Bioplex, Bio-Rad, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medición del colesterol plasmático (cromatografía líquida de proteínas rápida, FLPC)

- 10 La cuantificación de las lipoproteínas plasmáticas se realizó mediante cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC, AKTA purifier 10, GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.). Se inyectaron 50 µl de plasma individual y se separaron las lipoproteínas en una columna Superose™ 6 10/300 GL (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.) con NaCl 0,15 M a pH 7,4 como fase móvil a un caudal de 1 ml/min. El efuente se recogió en fracciones de 0,3 ml, luego se determinó el contenido de colesterol y TG en cada fracción como se describió anteriormente. La cuantificación del colesterol en
- 15 clases de lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL) se realizó midiendo el porcentaje de área pico y multiplicando cada porcentaje por la cantidad total de colesterol. El colesterol total en plasma se midió con kits comerciales (CHOD-PAP; BIOLABO SA, Maizy, Francia).

Medición de la energía fecal

- 20 El contenido de energía fecal se midió en muestras fecales recolectadas después de un período de 24 horas durante la última semana de tratamiento mediante el uso de un calorímetro de bomba (Mouse Clinical Institute, Illkirch, Francia).

Análisis metabolómicos urinarios

- 25 Se prepararon y midieron muestras de orina de ratón en un espectrómetro (Bruker) que operaba a una frecuencia de 600.22 MHz ¹H de acuerdo con el protocolo previamente publicado (Dona AC, 2014); los espectros de ¹H RMN se procesaron y analizaron luego como se describió previamente (Dumas et al., 2006. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103 (33): 12511-6).

Cuantificación de lipopolisacárido plasmático

- 35 La concentración de LPS en sangre de la vena porta se midió usando un sistema de multicartucho Endosafe (Charles River Laboratories) basado en la metodología cromogénica cinética del lisado de amebocitos de Limulus (LAL) que mide la intensidad del color directamente relacionada con la concentración de endotoxina en una muestra. El plasma se diluyó 1/10 con tampón libre de endotoxina para minimizar las interferencias en la reacción (inhibición o mejora) y se calentó durante 15 minutos a 70 °C. Cada muestra se diluyó 1/100, 1/150, 1/200 o 1/400 con agua de reactivo LAL sin endotoxina (Charles River Laboratories) y se trató por duplicado y se incluyeron dos puntas para cada muestra en la determinación. Todas las muestras han sido validadas para la recuperación y el coeficiente de variación. El límite
- 40 inferior de detección fue 0.005 UE/ml.

Determinación de la temperatura de pasteurización y el rango de tiempo

- 45 Los viales que contenían bacterias vivas se sumergieron en un baño de agua ajustado a 50, 60, 70, 80 o 90 °C durante 15 segundos (0,25 minutos), 2 minutos, 5 minutos, 15 minutos y 30 minutos. La inactivación de *A. muciniphila* se evaluó colocando 50 µL de contenido de vial sin diluir en medio de infusión de cerebro y corazón (BHI)-Agar suplementado con 5% de moco y buscando la presencia de unidades formadoras de colonias (ufc) después de 7 días de incubación en 37 °C en recipiente anaeróbico. El contenido de un vial esterilizado en autoclave se utilizó como control negativo y el contenido de un vial no sumergido en un baño de agua se utilizó como control positivo. Este
- 50 experimento se realizó en dos momentos diferentes.

Medio a base de moco

- 55 *A. muciniphila* se cultivó en medio a base de moco, se lavó y se concentró como se describió anteriormente (Everard et al., 2013. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110: 9066-9071). Además de un lote de células sin tratar, una parte se sometió a un tratamiento térmico suave mediante una incubación de 30 minutos a 70 °C.

Medio sin moco

- 60 *A. muciniphila* se cultivó en un medio sin moco que consistía en medio anaeróbico basal como se describió anteriormente (Derrien et al., 2004. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1469-1476) que contenía 16 g/L peptón a base de soja, glucosa 25 mM y N-acetilglucosamina 25 mM y L-treonina 4 g/L. Las células se lavaron y concentraron como se describió previamente (Everard et al., 2013. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110: 9066-9071). Además de un lote de células sin tratar, una parte se sometió a un tratamiento térmico suave mediante una incubación de 30 minutos a 70 °C.

65

Evaluación de la seguridad de la administración oral de *A. muciniphila* viva y pasteurizada en voluntarios con sobrepeso u obesidad

Los resultados presentados son informes de seguridad provisionales de veinte pacientes con sobrepeso y obesidad (índice de masa corporal $> 25 \text{ kg/m}^2$) que presentan un síndrome metabólico según la definición de ATP III de NCEP (cualquiera de los tres de los cinco criterios siguientes: glucemia en ayunas $> 110 \text{ mg/dl}$, presión de sangre $\geq 130/85 \text{ mm Hg}$ o tratamiento antihipertensivo, trigliceridemia en ayunas $\geq 150 \text{ mg/dl}$, colesterol HDL $< 40 \text{ mg/dl}$ para hombres, 50 mg/dl para mujeres y/o circunferencia de cintura $> 102 \text{ cm}$ para hombres, 88 cm para mujeres). Los pacientes fueron reclutados voluntariamente de las Cliniques Universitaires Saint Luc, Bruselas, Bélgica entre diciembre de 2015 y mayo de 2016. Los sujetos fueron asignados a cualquiera de los brazos de tratamiento siguiendo un diseño de bloques aleatorios. Los criterios de exclusión fueron: presencia de enfermedades agudas o crónicas progresivas o crónicas no estabilizadas, consumo de alcohol (> 2 vasos/día), cirugía bariátrica previa, cualquier cirugía en los 3 meses previos al estudio o planificada en los próximos 6 meses, embarazo o embarazo planificado en los próximos 6 meses, actividad física regular (> 30 minutos de deporte 3 veces por semana), consumo de suplementos dietéticos (ácidos grasos omega-3, probióticos, prebióticos, estanoles/esteroides vegetales) en el mes anterior al estudio, enfermedad inflamatoria intestinal o síndrome intestinal irritable, neuropatía autonómica gastrointestinal diabética (tal como gastroparesia o motilidad gastrointestinal reducida), consumo de más de 30 g de fibras dietéticas por día, consumo de una dieta vegetariana o inusual, intolerancia a la lactosa o alergia a las proteínas de la leche, intolerancia al gluten, tratamiento actual con medicamentos que influyen en los parámetros de interés (fármacos hipoglucemiantes tales como la metformina, Inhibidores de DPP-4, agonistas del receptor de GLP-1, acarbosa, sulfonlureas, glinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de SGLT2, insulina, lactulosa, consumo de antibióticos en los 2 meses previos al estudio, glucocorticoides, agentes inmunosupresores, estatinas, fibratos, orlistat, colestiramina, o ezetimiba) y hemoglobina glucosilada de línea base (HbA1c) $> 7,5\%$. La Commission d'Ethique Biomedicale Hospitalo-facultaire de la Université catholique de Louvain (Bruselas, Bélgica) proporcionó la aprobación ética para este estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada participante. El ensayo se registró en Clinicaltrials.gov como NCT02637115.

Los sujetos fueron asignados para recibir una dosis diaria de placebo (un volumen equivalente de PBS estéril que contenía glicerol), 10^{10} UFC de *A. muciniphila* viva (Akk S - 10^{10}), 10^9 UFC de *A. muciniphila* viva (Akk S - 10^9) o 10^{10} CFU pasteurizada de *A. muciniphila* (Akk P - 10^{10}) (el placebo y las bacterias se produjeron a un nivel de calidad alimentaria de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación) durante 3 meses. Se recolectaron muestras de sangre al inicio del tratamiento y una porción se envió directamente al laboratorio del hospital para medir los parámetros clínicos relevantes. Se utilizaron diferentes tubos según el parámetro clínico: tubos recubiertos con EDTA para recuento de glóbulos blancos, tubos recubiertos con fluoruro de sodio para glucemia en ayunas, tubos recubiertos con citrato para ensayos de coagulación y tubos recubiertos con heparina de litio para urea y actividades enzimáticas. Después de 2 semanas de tratamiento, los pacientes regresaron al hospital para una visita de seguridad, donde se recolectaron muestras de sangre para permitir la comparación de los parámetros clínicos con los valores de línea base.

Los pacientes y los médicos estaban cegados al tratamiento. Para la Figura 14 y las Tablas 3-5, el número de sujetos por grupo es: Placebo: 5, Akk S - 10^{10} : 5, Akk S - 10^9 : 5, Akk P - 10^{10} : 5.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias \pm E.E.M. Las diferencias entre dos grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student de dos colas para datos no apareados. Los conjuntos de datos que incluían a más de dos grupos se evaluaron mediante ANOVA seguido de pruebas post hoc de Tukey. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes con $P < 0.05$, según el análisis estadístico ANOVA post-hoc. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$.

Se realizó un análisis ANOVA bidireccional con un purueba posterior de Bonferonni en mediciones repetidas para la evolución de la glucemia durante el OGTT, para la repartición de colesterol en lipoproteínas específicas y para análisis de transferencia Western.

Los datos humanos se expresan como la media \pm SD. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los valores observados en la línea base y en el momento de la visita de seguridad se evaluaron mediante una prueba de rango con signo de pares emparejados de Wilcoxon. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Resultados

Experimentos in vitro

Para optimizar el protocolo de pasteurización, primero se incubaron viales que contenían *A. muciniphila* en baños de agua ajustados a un rango de temperatura para diferentes momentos. La pasteurización se consideró eficaz cuando no se pudieron observar bacterias después de sembrar el contenido del vial tratado en un medio rico (Tabla 2).

Tabla 2: Combinaciones de temperaturas y tiempos de exposición para pasteurización
“Vivo” corresponde a placas donde las ufc se obtuvieron en grandes cantidades. “Límite” corresponde a placas donde se observaron entre 1 y 3 ufc. Inactivado corresponde a placas donde no se pudieron observar ufc.

	Temperatura (°C)				
	50	60	70	80	90
Exposición (minutos)	0,25	Vivo	Vivo	Vivo	Vivo
	2	Vivo	Vivo	Inactivado	Inactivado
	5	Vivo	Vivo	Límite	Inactivado
	15	Vivo	Límite	Límite	Inactivado
	30	Límite	Inactivado	Inactivado	Inactivado

Para los experimentos adicionales, se seleccionó una pasteurización de 30 minutos a 70 °C. Además de la viabilidad, se ha probado el efecto de la pasteurización sobre la actividad de dos *A. muciniphila* fucosidasas y 2 sulfatasas (codificadas por los genes *Amuc_0010*, *Amuc_0146* y *Amuc_0121* y *Amuc_1074*; van Passel et al., 2011. PLoS One. 6 (3): e16876). Estas enzimas son relevantes para la degradación de la mucina. Para este propósito, sus genes se sobreexpresaron en *Escherichia coli* como se describe con una etiqueta His C-terminal (Tailford et al., 2015. Nat. Commun. 6: 7624) y las proteínas purificadas se usaron para el análisis. Las actividades enzimáticas se determinaron antes y después de 30 minutos a 70 °C y este tratamiento resultó completamente en una inactivación de más de 20 veces de las actividades enzimáticas.

Experimentos in vivo

En una primera serie de experimentos, los ratones alimentados con una dieta alta en grasas se trataron diariamente con una sonda oral de *A. muciniphila* viva cultivada en un medio a base de moco o sin moco. Otro grupo de ratones se trató con una sonda oral de *A. muciniphila* cultivado en un medio sin moco y se inactivó mediante pasteurización (30 minutos a 70 °C). Los ratones alimentados con pienso estándar se utilizaron como grupo de control. El tratamiento se continuó durante 4 semanas.

Se observó que el tratamiento con *A. muciniphila* viva redujo el peso corporal inducido por la dieta alta en grasas y la ganancia de masa grasa, independientemente del medio de crecimiento utilizado (Figura 1a-b). Sorprendentemente, *A. muciniphila* pasteurizada ejerció un efecto más fuerte que la bacteria viva, ya que los ratones tratados con células pasteurizadas mostraron un aumento de peso corporal y un aumento de masa grasa similar a los ratones alimentados con una dieta de control (Figura 1a-b). El índice de adiposidad, que se muestra como la suma de los depósitos de tejido adiposo subcutáneo, visceral y epididimario, aumentó significativamente en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Figura 2). La administración de *A. muciniphila* contrarrestó este aumento, en un grado similar, independientemente del medio de crecimiento o la pasteurización.

A continuación, se confirmaron los resultados anteriores en términos de tolerancia a la glucosa. De hecho, una dieta alta en grasas conduce a un aumento de la glucemia después de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT), lo que resulta en un área bajo la curva (AUC) significativamente mayor medida entre 30 minutos antes y 120 minutos después de la administración de glucosa (Figura 3a-b).

La administración de *A. muciniphila* mitigó este aumento, dando lugar a valores intermedios de AUC, una vez más independientemente del medio de crecimiento y la pasteurización.

Cuando se tiene en cuenta la insulinemia de los ratones, el índice de resistencia a la insulina de los ratones alimentados con una dieta rica en grasas fue significativamente mayor que el de los ratones de control (Figura 3c). El tratamiento con *A. muciniphila* cultivada en un medio a base de moco dio como resultado valores intermedios del índice de resistencia a la insulina (RI) entre los ratones de control y los ratones alimentados con una dieta rica en grasas no tratados. Sin embargo, aunque el índice de IR de los ratones tratados con *A. muciniphila* cultivados en un medio sin moco fue un 15% más bajo que el de los ratones no tratados alimentados con una dieta alta en grasas, fue significativamente más alto que el de los ratones de control, mientras que la *A. muciniphila* pasteurizada normalizó completamente el índice de IR de ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Figura 3c), mostrando así que la pasteurización aumenta los efectos de *Akkermansia muciniphila* sobre la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina.

Anteriormente, se descubrió que el tratamiento con *A. muciniphila* podría afectar la función de barrera intestinal mediante la modulación de la producción de péptidos antimicrobianos y la regulación del grosor de la capa de moco. Para aumentar adicionalmente nuestra comprensión de la interferencia entre *A. muciniphila* y la barrera intestinal, se midió la expresión de dos marcadores de proteínas de unión estrecha intestinal, a saber, *Ocln* y *Cldn3*, que codifican las proteínas Occludin y Claudin 3; así como *Lyz1* que codifica el péptido antimicrobiano Lisozima 1. En el yeyuno, el tratamiento de ratones alimentados con HFD con *A. muciniphila* viva o pasteurizada aumentó la expresión de *Ocln*, mientras que *A. muciniphila* pasteurizada aumentó específicamente la expresión de *Lyz1* (Figura 4a). En el íleon, el tratamiento con *A. muciniphila* viva y pasteurizada aumentó la expresión de *Cldn3* y *Lyz1* (Figura 4b). Estos efectos sobre los marcadores de integridad intestinal dieron como resultado una normalización completa del LPS plasmático en los ratones tratados (Figura 4c), lo que demuestra que tanto la forma viva como la pasteurizada de *A. muciniphila* pueden fortalecer la barrera intestinal y disminuir la endotoxemia metabólica.

En un segundo y tercer conjunto de experimentos, se trataron ratones de dieta alta en grasas con *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco, vivo o pasteurizado, para confirmar los efectos obtenidos anteriormente. Los ratones alimentados con pienso estándar se utilizaron como grupo de control y el tratamiento se llevó a cabo durante cinco semanas. El tratamiento con *A. muciniphila* cultivada en un medio sin moco condujo a una disminución del 10 al 15% en el aumento de peso corporal, el aumento de masa grasa y el índice de adiposidad en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, aunque sin alcanzar significación estadística (Figuras 5 y 5). La administración de *A. muciniphila* pasteurizada normalizó completamente estos parámetros, mostrando una vez más un efecto más fuerte después de la pasteurización.

También se obtuvieron resultados similares en términos de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. De hecho, mientras que los ratones no tratados alimentados con una dieta alta en grasas exhibieron un AUC más alto durante el curso de la OGTT (Figura 7a-b), el tratamiento con *A. muciniphila* viva o pasteurizada normalizó este parámetro. El índice de IR de los ratones tratados con *A. muciniphila* cultivados en un medio sin moco fue un 20% más bajo que el de los ratones alimentados con una dieta alta en grasas sin tratar, pero todavía significativamente más alto que el de los ratones de control. Sin embargo, el tratamiento con *A. muciniphila* pasteurizada normalizó completamente el índice de IR con una disminución del doble en comparación con el grupo alimentado con una dieta alta en grasas no tratada (Figura 7c).

En el tercer conjunto de experimentos, mientras que los ratones no tratados alimentados con una dieta alta en grasas exhibieron un AUC más alto durante el transcurso de la OGTT, el tratamiento con *A. muciniphila* viva o pasteurizada disminuyó significativamente el AUC, mostrando una mejora de la tolerancia a la glucosa (Figura 8a- B). Con el fin de investigar más a fondo los efectos de *A. muciniphila* sobre la sensibilidad a la insulina, además de la OGTT, se analizó la fosforilación inducida por insulina del receptor de insulina (IR) y su mediador aguas abajo Akt en el hígado en la treonina (Akt^{thr}) y serina (Akt^{ser}) después de la inyección de insulina o solución salina en la vena porta (Figura 8 c-e). Como se describió anteriormente, los ratones alimentados con una dieta rica en grasas no tratados mostraron una fosforilación disminuida de todas las proteínas evaluadas en comparación con los ratones CT ND, alcanzando importancia para Akt^{thr} (Figura 8d). El tratamiento con *A. muciniphila* tendió a contrarrestar estos efectos, con niveles significativamente más altos de p- Akt^{ser} en ratones tratados con la bacteria viva (Figura 8e) en comparación con los ratones alimentados con HFD no tratados.

Luego se midió el diámetro medio de los adipocitos en el depósito adiposo subcutáneo, ya que se sabe que aumenta en la obesidad y contribuye al desarrollo de inflamación y resistencia a la insulina (Rosen y Spiegelman, 2014. Cell. 156: 20-44). De acuerdo con la literatura, se observó que una dieta alta en grasas conduce a un aumento de diámetro. El tratamiento con *A. muciniphila* viva cultivada sin moco no afectó el aumento de diámetro inducido por la dieta alta en grasas. Sin embargo, la administración de *A. muciniphila* pasteurizada restauró el diámetro a niveles similares a los de los ratones de control (Figura 9a-b). El tratamiento con *A. muciniphila* pasteurizada también normalizó la concentración de leptina a niveles similares a los observados en ratones de control (Figura 9c).

El siguiente parámetro analizado se refería a la dislipidemia inducida por una dieta rica en grasas. Se evaluaron los efectos de *A. muciniphila* sobre la hipertrigliceridemia y la hipercolesterolemia, que se asocia con aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Aunque no se pudo observar ninguna diferencia entre los ratones de control y los alimentados con dieta alta en grasas no tratados, se observó que el tratamiento con *A. muciniphila* pasteurizada conduce a una reducción significativa (entre 15 y 20%) de los niveles de triglicéridos en plasma (Figura 10). En cuanto al colesterol plasmático, el tratamiento con *A. muciniphila* viva o pasteurizada corrigió la hipercolesterolemia inducida por HFD, con descensos significativos del colesterol HDL plasmático y una tendencia similar del colesterol LDL (Figura 11).

Para explicar mejor cómo *A. muciniphila* viva y pasteurizada reduce el peso corporal y el aumento de masa grasa sin afectar la ingesta de alimentos en una dieta alta en grasas, se midió el contenido calórico fecal y se encontró que se incrementó significativamente en ratones tratados con *A. muciniphila* pasteurizada pero no con *A. muciniphila* viva (Figura 12). Estos resultados sugirieron una disminución en la absorción de energía y por lo tanto en la excreción de energía en las heces después de la administración de *A. muciniphila* pasteurizada, lo que podría, al menos en parte, explicar los mayores efectos observados con *A. muciniphila* pasteurizada.

A continuación, se evaluó si el tratamiento con *A. muciniphila* podría reducir el desplazamiento inducido por HFD en el metaboloma urinario del huésped (Figura 13). La dieta alta en grasas fue el factor principal que influyó en los perfiles metabólicos no dirigidos basados en 1H RMN en la primera puntuación O-PLS-DA (Tpred1), mientras que el tratamiento con *A. muciniphila* pasteurizada se agruparon por separado de todos los demás grupos con respecto a la segunda puntuación (Tpred2, Figura 13). Esto dio como resultado una normalización del desplazamiento inducido por HFD del 37% con la bacteria pasteurizada y del 17% con la bacteria viva (Figura 13).

En conjunto, estos datos sugieren que los efectos de *A. muciniphila* sobre el metabolismo del huésped son en su mayoría similares independientemente del medio de cultivo utilizado. Más sorprendentemente, también muestran que la pasteurización potencia los efectos de *A. muciniphila*. Esto es de sumo interés ya que la pasteurización podría disminuir los problemas de bioseguridad asociados con el uso de una bacteria viva mientras aumenta la eficacia de *A. muciniphila* en el tratamiento de la obesidad y los trastornos asociados.

Evaluación de la seguridad de la administración oral de *A. muciniphila* viva y pasteurizada en voluntarios con sobrepeso u obesidad

Se evaluó la seguridad y tolerabilidad de la administración oral de *A. muciniphila* en voluntarios con sobrepeso y obesos tratados con diferentes dosis de *A. muciniphila* viva (Akk S - 10^{10} y Akk S - 10^9) o *A. muciniphila* pasteurizada (Akk P - 10^{10}) como parte de un estudio clínico en curso que prueba la eficacia de esta bacteria contra el síndrome metabólico. Las características antropomórficas de los pacientes al inicio de la intervención se informan en la Tabla 3.

Tabla 3: Características descriptivas al inicio del tratamiento para todos los sujetos incluidos en el estudio clínico (n = 5)

	Placebo	Akk S - 10^{10}	Akk S - 10^9	Akk P - 10^{10}
Sexo (M/W)	1/4	3/2	2/3	2/3
Edad (Años)	53.00 ± 10.98	50.40 ± 4.72	50.60 ± 6.69	52.40 ± 7.99
Peso corporal (Kg)	102.60 ± 13.53	111.10 ± 19.52	103.80 ± 17.03	122.50 ± 12.67
Índice de masa corporal (Kg/m ²)	35.84 ± 5.98	38.48 ± 5.37	36.30 ± 3.12	40.71 ± 5.71
Circunferencia de la cintura (cm)	116.60 ± 13.03	119.50 ± 12.35	115.60 ± 7.20	124.90 ± 8.10
Glucemia en ayunas (mg/dl)	100.50 ± 10.52	96.13 ± 2.24	108.30 ± 12.91	106.30 ± 11.80

Se analizaron varios parámetros clínicos investigados en las evaluaciones de seguridad de los probióticos (Jones et al., 2012. Food. Chem. Toxicol. 50: 2216-2223; Burton et al., 2011. Food Chem. Toxicol. 49 (9): 2356-64; Wind et al., 2010. Br. J. Nutr. 104 (12): 1806-16) antes y dos semanas después de iniciar el tratamiento. No se observaron cambios significativos en los marcadores relacionados con la inflamación y la hematología, la función renal, hepática y muscular con ninguna formulación de *A. muciniphila* (Figura 14A-K y Tabla 4).

Tabla 4: Características descriptivas al inicio del tratamiento para todos los sujetos incluidos en el estudio clínico (n = 5)

	Placebo		Akk S - 10^{10}		Akk S - 10^9		Akk P - 10^9	
Inflamación y hematología	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad
Proteína reactiva a C (mg dl ⁻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
Glóbulos blancos (10 ³ µL ⁻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
Tiempo de protrombina (seg)	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
Enzimas del hígado	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad
Actividad de la alanina aminotransferasa (IU l ⁻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

(continuación)

	Placebo	Akk S - 10 ¹⁰	Akk S - 10 ⁹	Akk P - 10 ⁹		Placebo	Akk S - 10 ¹⁰	Akk S -10 ⁹
Actividad de aspartato aminotransferasa (IU l ⁻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
Actividad de γ-glutamyl-transferasa (IU l ⁻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
Función del riñón	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad
Urea (mg dl ⁻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
Creatinina (mg dl ⁻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
Tasa de filtración glomerular (ml min ⁻¹ 1,73m ⁻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
Enzimas musculares	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad	Línea base	Seguridad
Actividad de la creatinina quinasa (IU l ⁻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
Actividad de lactato deshidrogenasa (TV l ⁻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

Además, la frecuencia de efectos adversos registrados fue similar en todos los grupos (Tabla 5).

5 Tabla 5: Proporción de pacientes que experimentaron efectos adversos autoinformados (n = 5)

	Placebo	Akk S - 10 ¹⁰	Akk S -10 ⁹	Akk P -10 ⁹
Nausea	1/5	0	2/5	1/5
Flatulencia	0	1/5	3/5	1/5
Hinchazón	1/5	1/5	0	0
Calambres	1/5	1/5	0	1/5
Borborismo	0	3/5	3/5	0
Reflujo gástrico	1/5	0	1/5	0

Algunos pacientes tratados con A. muciniphila viva notificaron borborismos, pero la diferencia con otros grupos no fue significativa.

Si bien el número de sujetos es limitado, estos primeros datos en humanos sugieren que tanto A. muciniphila viva como pasteurizada son bien tolerados en voluntarios obesos/con sobrepeso y parecen seguros para la administración oral.

Además, se observaron tendencias prometedoras en términos de masa grasa, glicemia y marcadores de inflamación al final del período de tratamiento para los pacientes tratados con la dosis alta de A. muciniphila viva y/o pasteurizada.

Listado de secuencias

<110> Université catholique de Louvain

Wageningen Universiteit

CANI, Patrice

<120> USO DE AKKERMANSIA PASTEURIZADA PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS METABÓLICOS

<130> CV - 542/PCT
 <160> 8
 5 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador RPL-19 Directo
 20 <400> 1
 gaaggtcaaa gggaatgtgt tca 23
 <210> 2
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador RPL-19 Inverso
 35 <400> 2
 ccttgtctgc cttcagcttg t 21
 40 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador Ocln Directo
 <400> 3
 atgtccggcc gatgtcttc 19
 55 <210> 4
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Cebador Ocln Inverso

<400> 4
 5 tttggctgct cttgggtctg tat 23
 <210> 5
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador Cldn3 Directo
 <400> 5
 20 tcatcggcag cagcatcatc ac 22
 <210> 6
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador Cldn3 Inverso
 <400> 6
 35 acgatggtga tcttgcctt gg 22
 <210> 7
 40 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador Lyzl Directo
 50 <400> 7
 gccaaaggtct acaatcggtg ttagttg 27
 <210> 8
 55 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Lyzl Inverso
 65 <400> 8

cagtcagcca gcttgacacc acg 23

REIVINDICACIONES

1. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo lipídico anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia; y dislipidemia aterogénica, en la que Akkermansia muciniphila está pasteurizada.
2. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que Akkermansia muciniphila se administra por vía oral.
3. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que una cantidad de Akkermansia muciniphila varía de aproximadamente $1,10^4$ a aproximadamente $1,10^{12}$ células, más preferiblemente de aproximadamente $1,10^5$ a aproximadamente $1,10^{11}$ células, e incluso más preferiblemente se administran al sujeto de aproximadamente $1,10^6$ a aproximadamente $1,10^{10}$ células.
4. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que Akkermansia muciniphila se coadministra con otra cepa probiótica y/u otra bacteria y/o microorganismos con efectos beneficiosos y/o con uno o más prebióticos.
5. Una composición para uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto que comprende Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en asociación con un excipiente, en la que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo de lípidos anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia; y dislipidemia aterogénica.
6. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha composición es una composición nutricional.
7. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la que dicha composición se administra por vía oral.
8. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto que comprende Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo de lípidos anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia; y dislipidemia aterogénica.
9. Un medicamento para uso en el tratamiento de un trastorno metabólico en un sujeto que comprende Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad; síndrome metabólico; trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o la resistencia a la insulina; Diabetes Mellitus, incluida la diabetes tipo 2; intolerancia a la glucosa; metabolismo de lípidos anormal; hiperglucemia; dislipidemia; enfermedades de la función de barrera que incluyen enfermedad inflamatoria del intestino, más particularmente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable; hipercolesterolemia; y dislipidemia aterogénica.

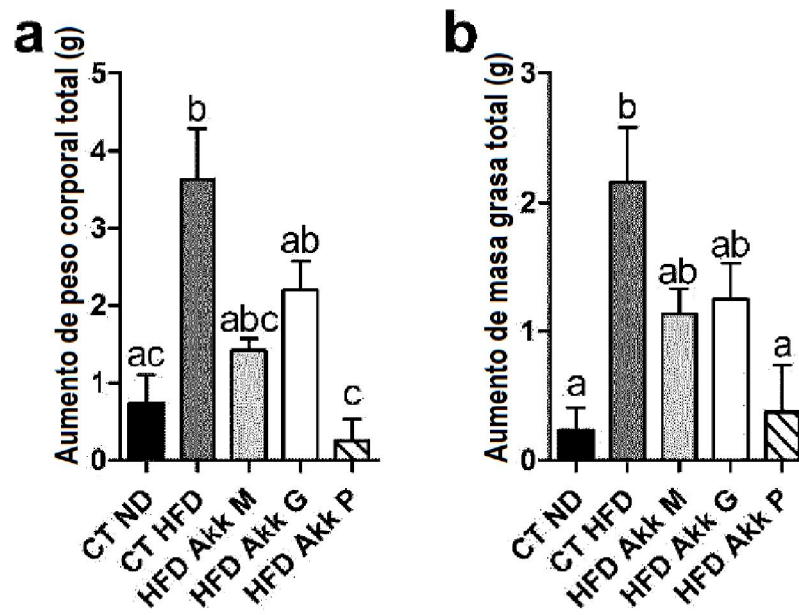


FIG. 1

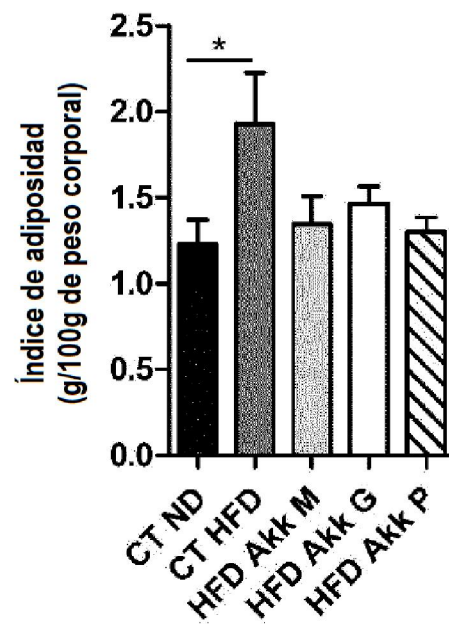


FIG. 2

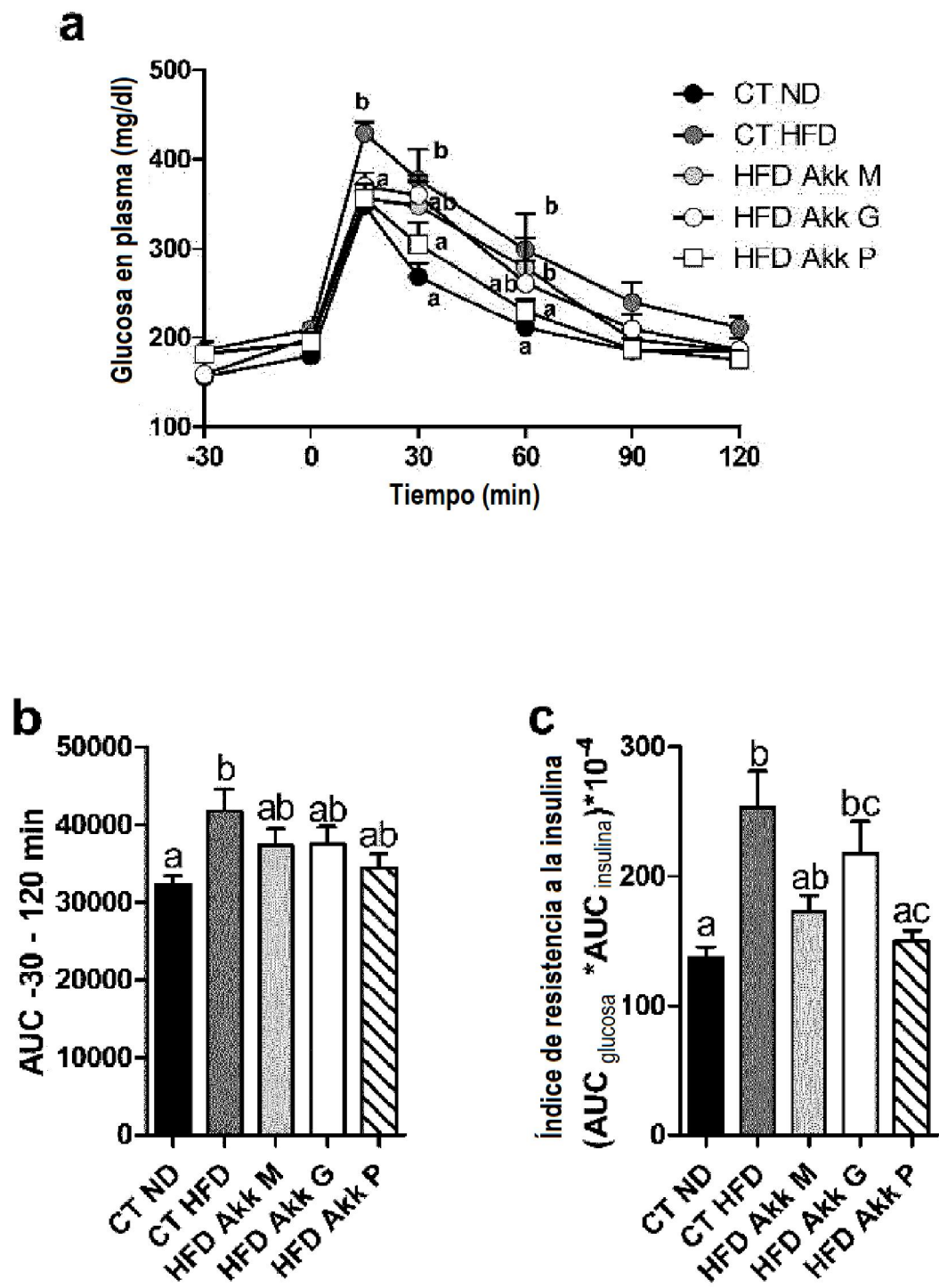


FIG. 3

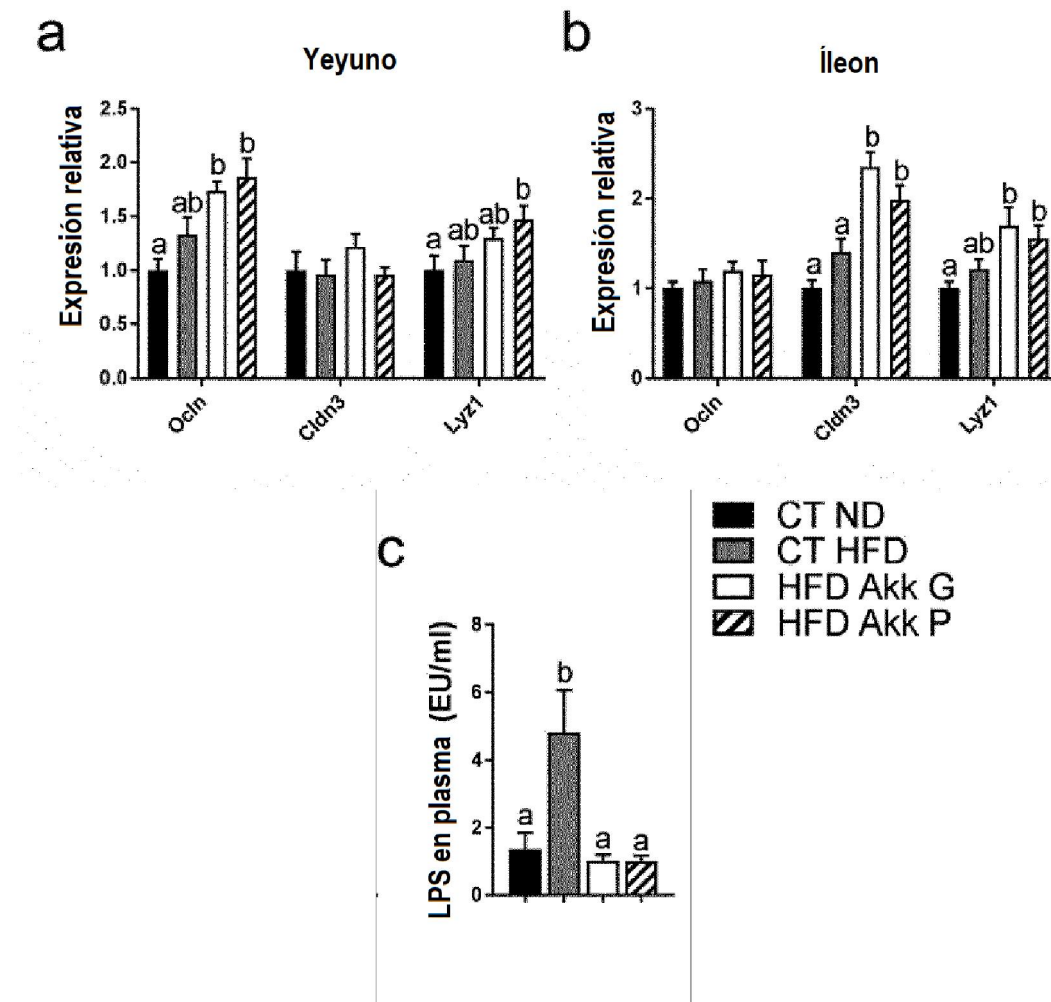


FIG. 4

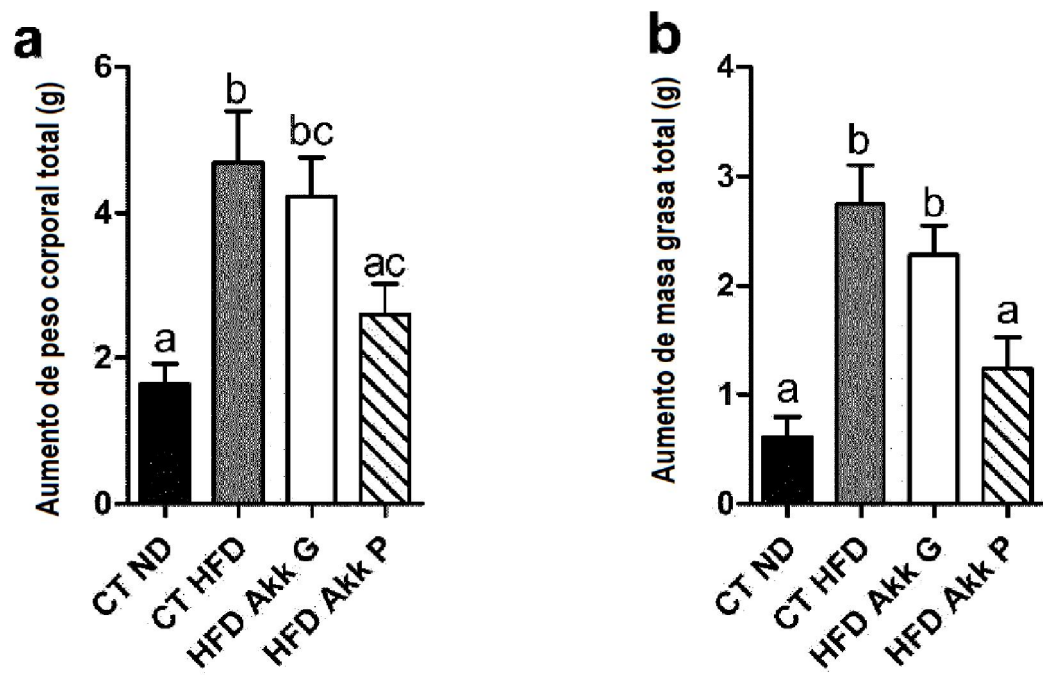


FIG. 5

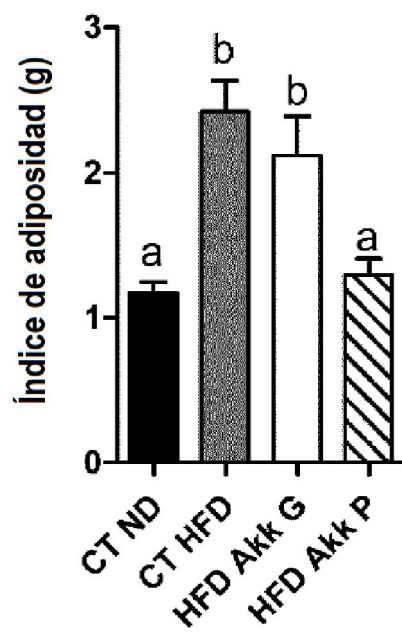


FIG. 6

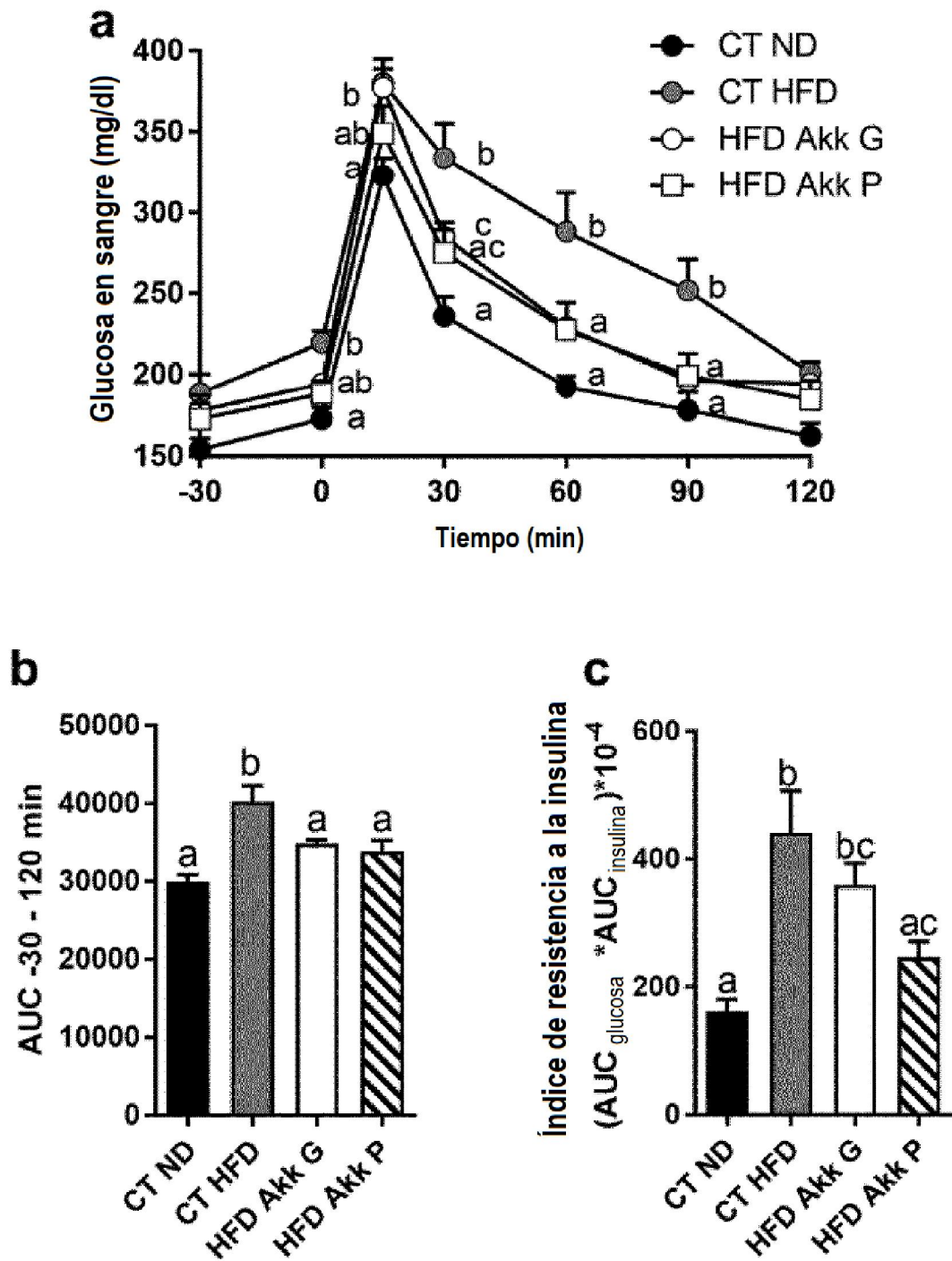


FIG. 7

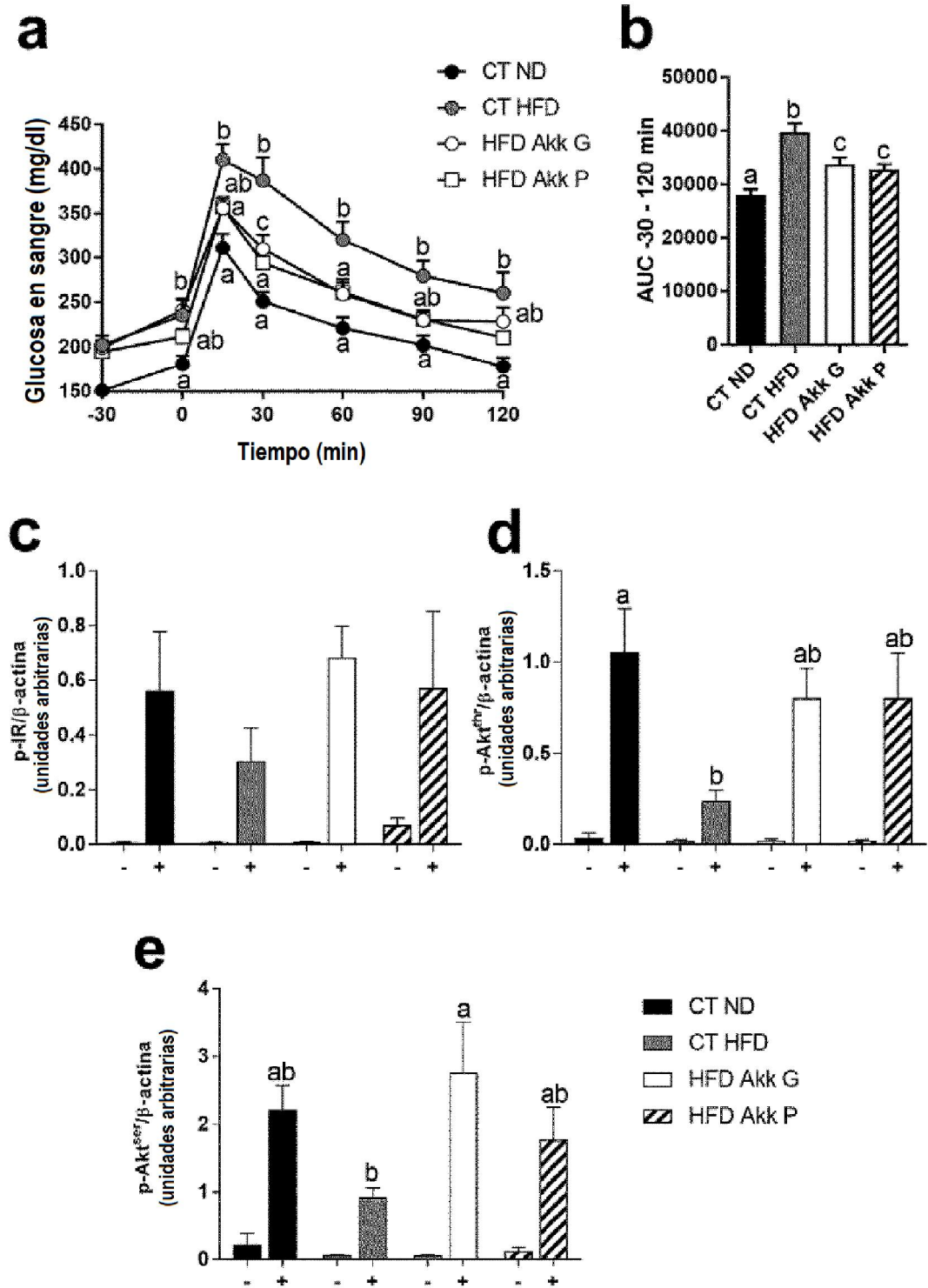


FIG. 8

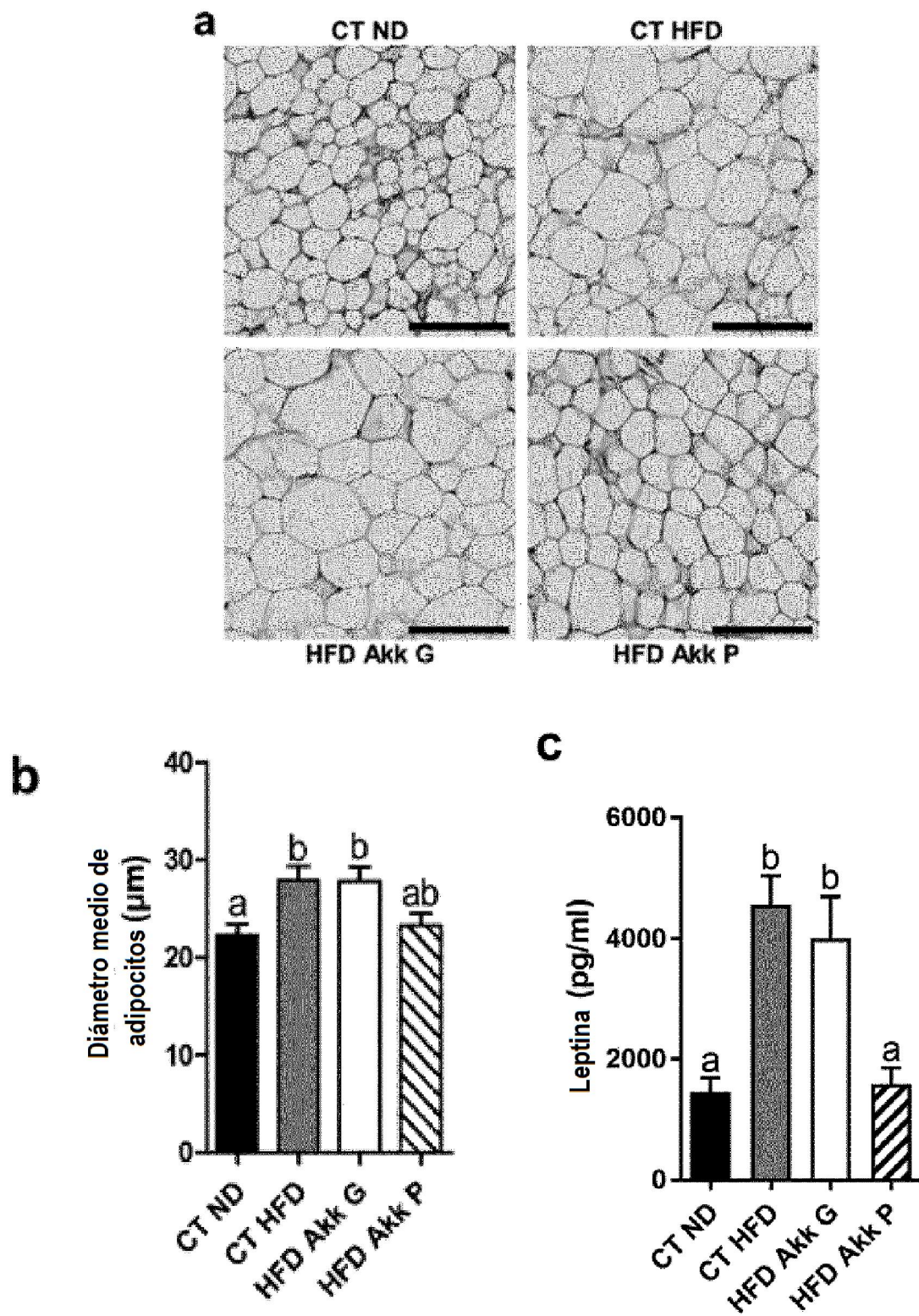


FIG. 9

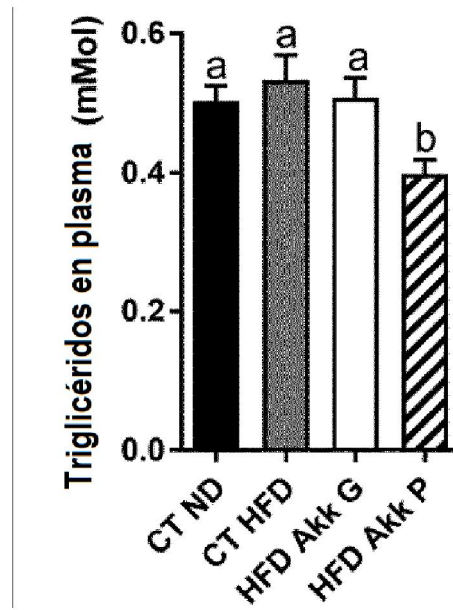


FIG. 10

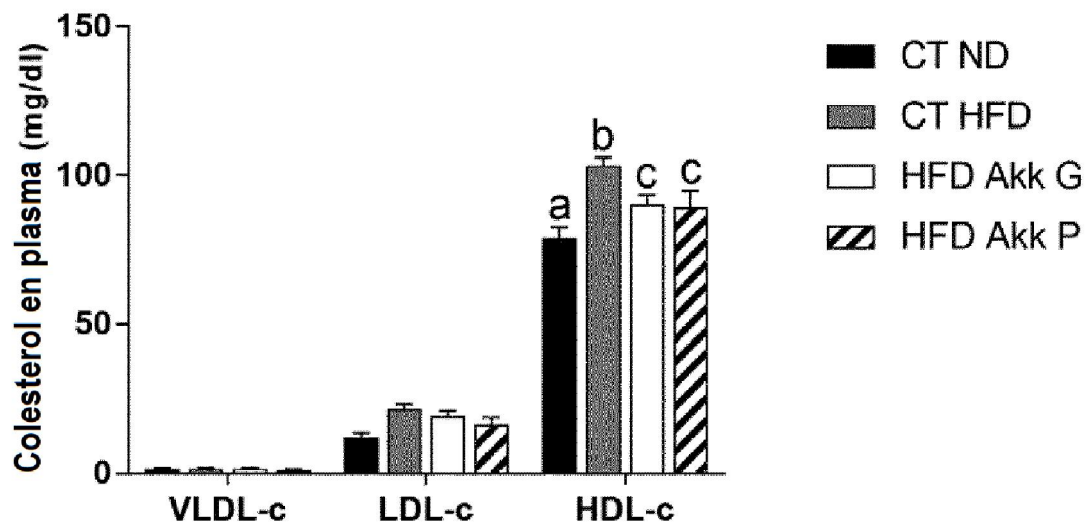


FIG. 11

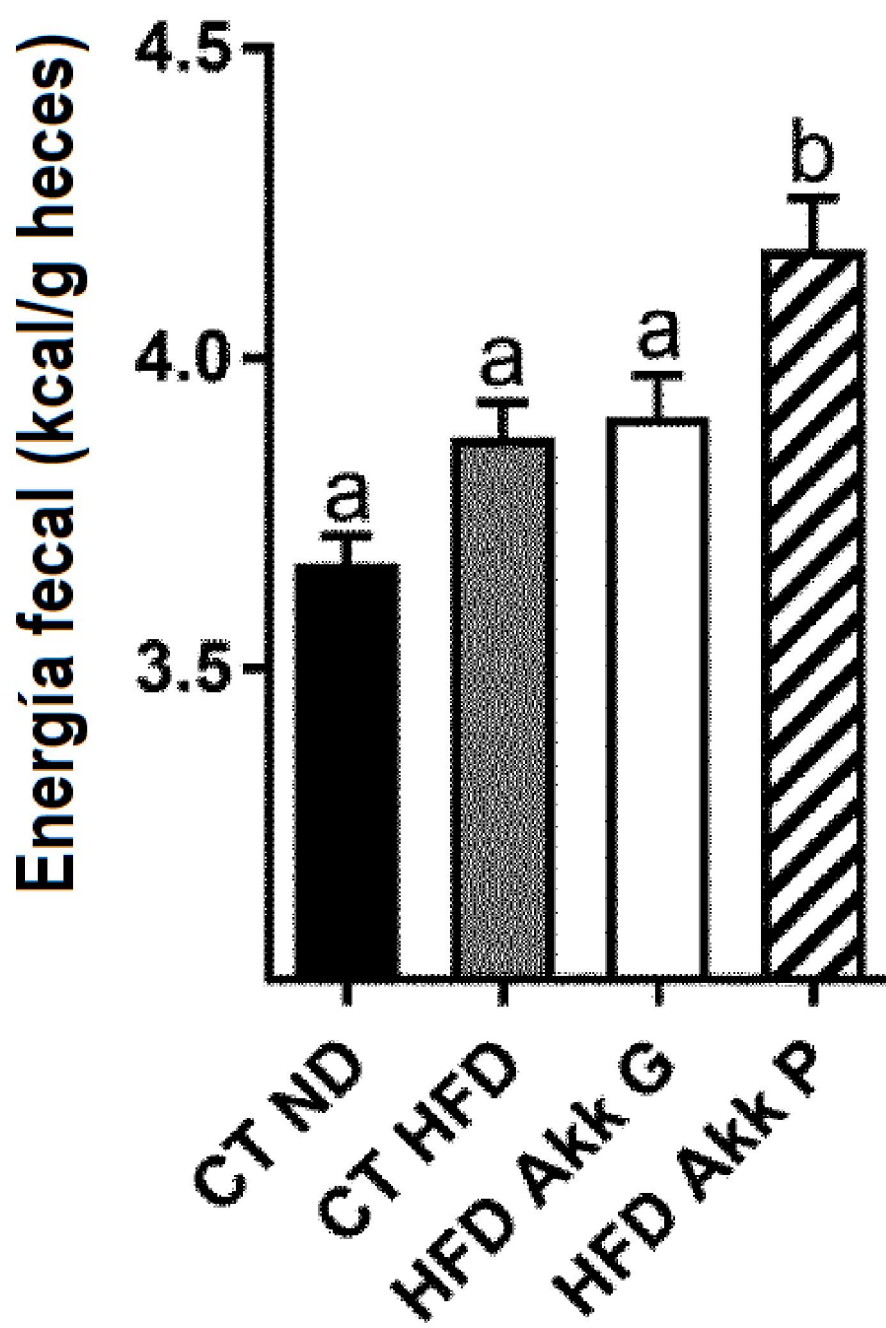


FIG. 12

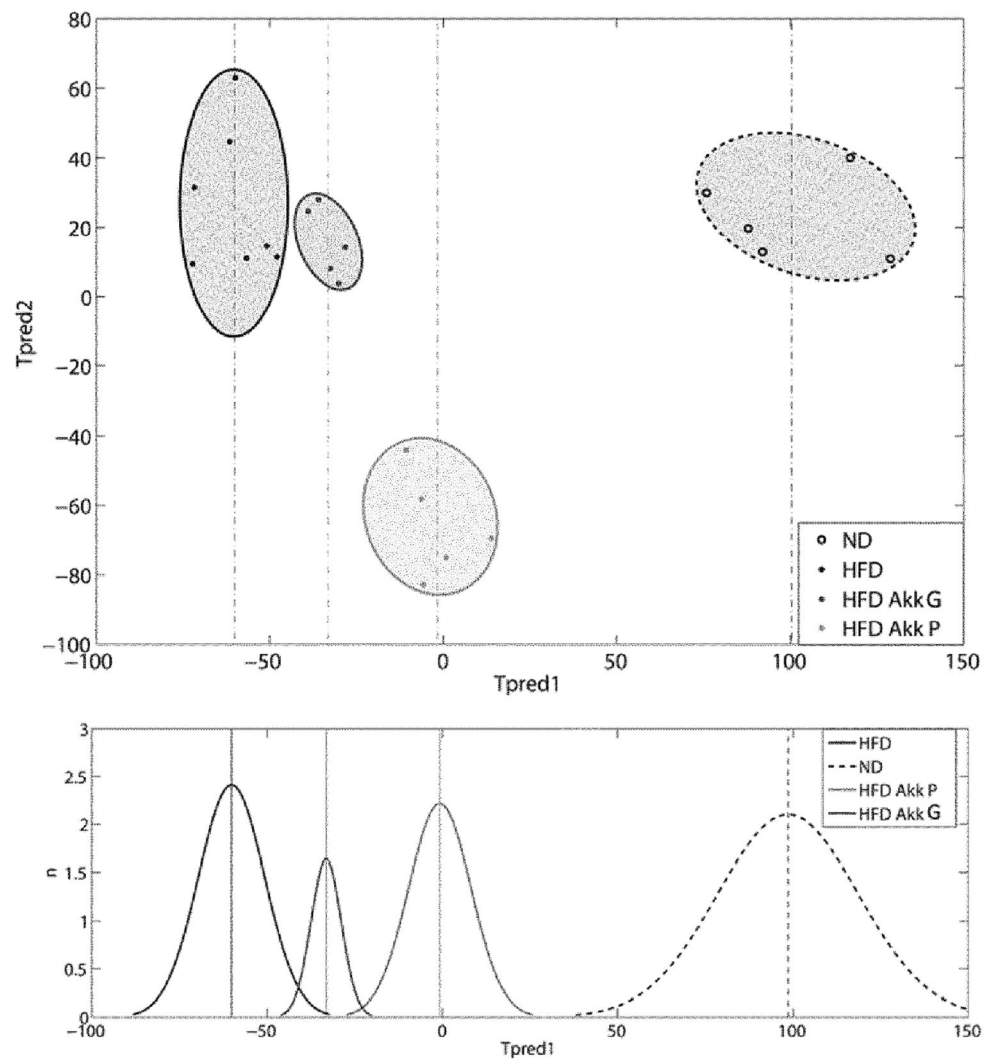


FIG. 13

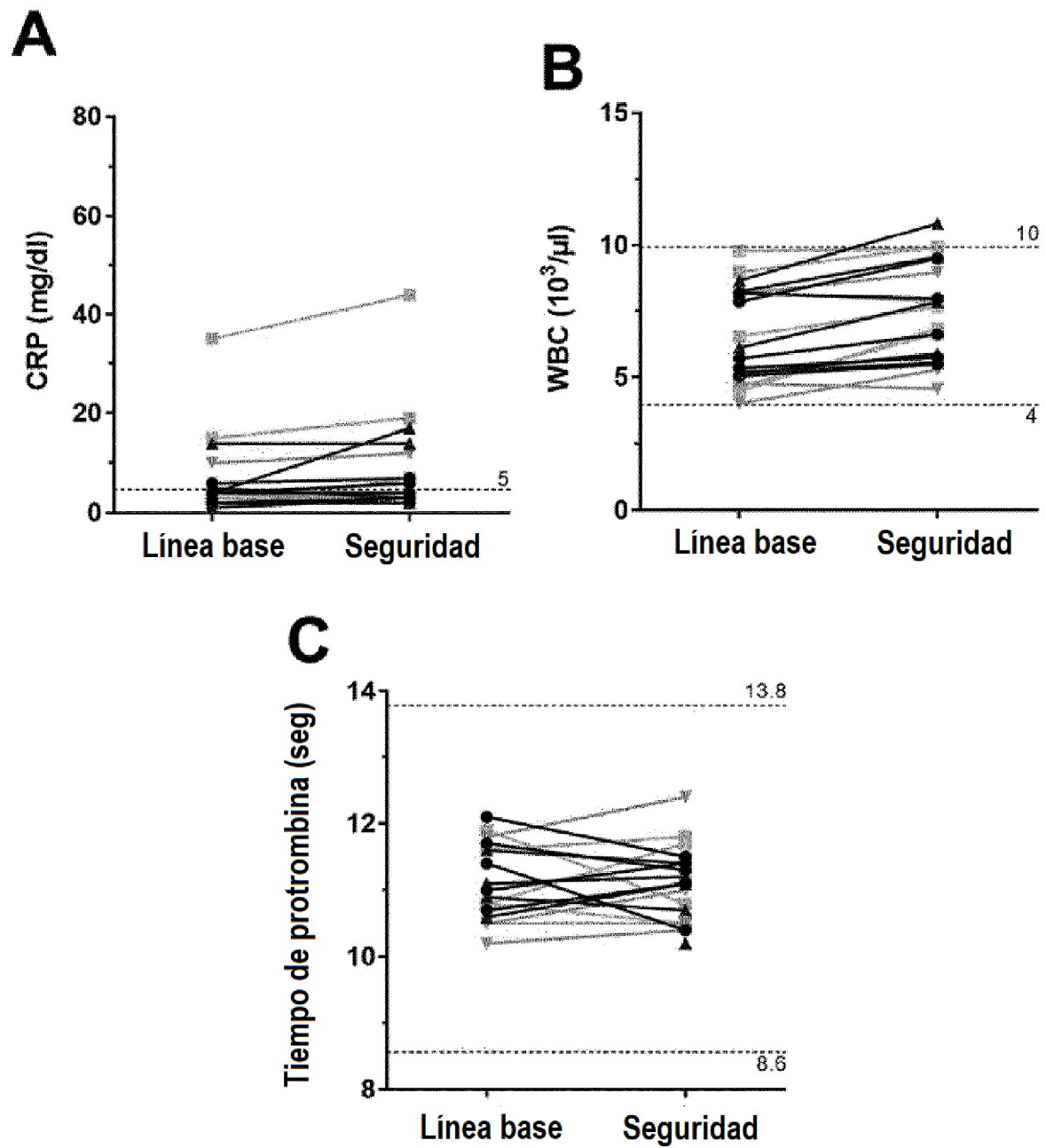


FIG. 14A-C

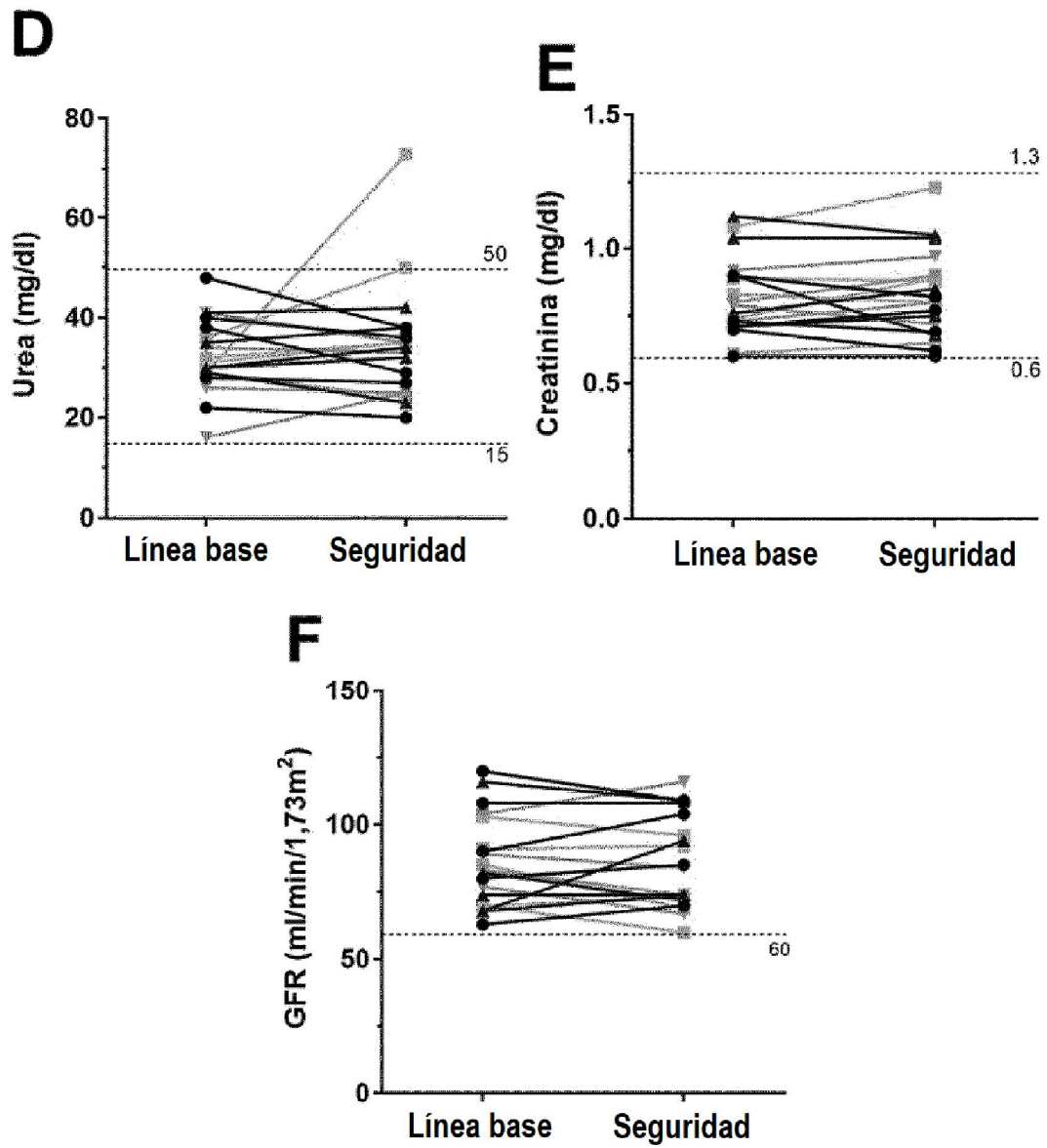
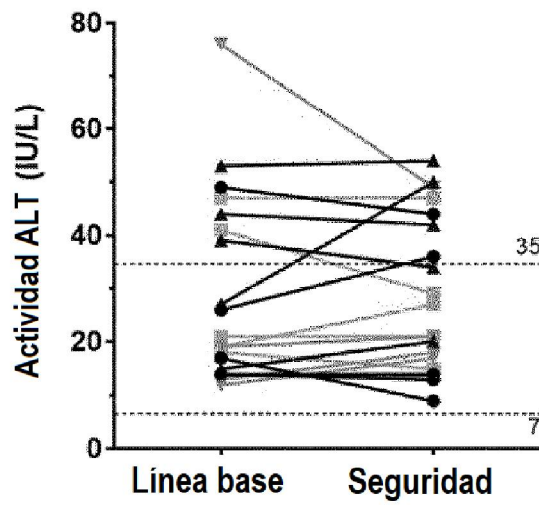
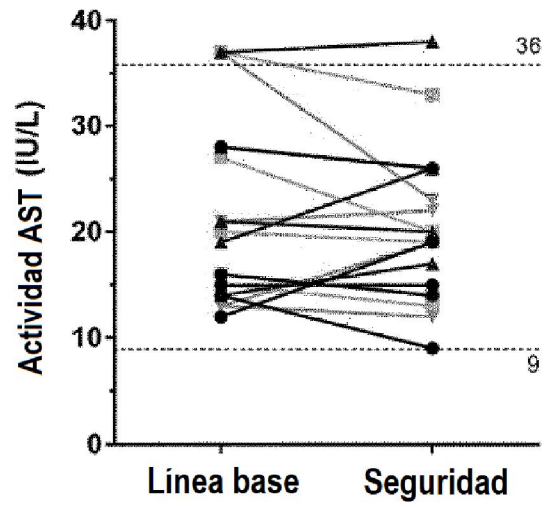


FIG. 14D-F

G



H



I

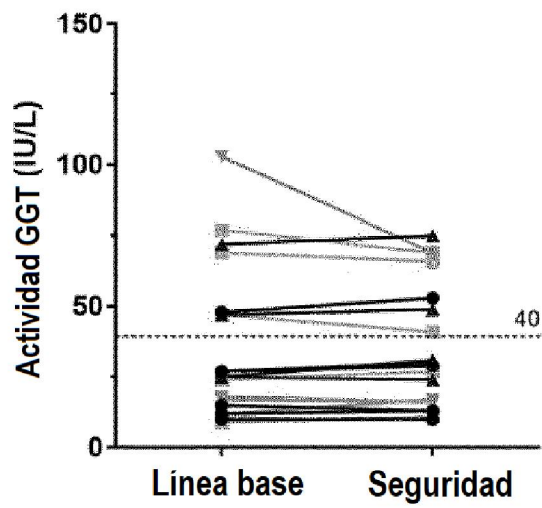


FIG. 14G-I

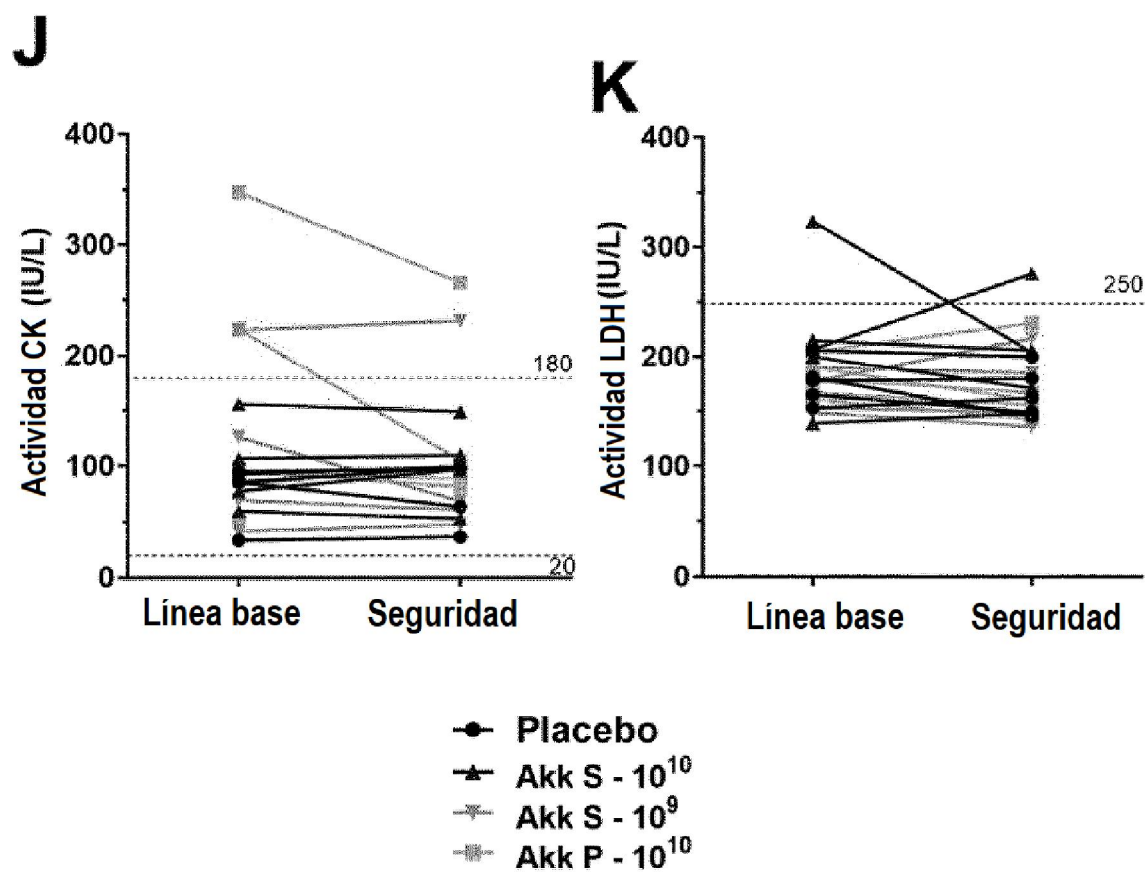


FIG. 14J-K