



(51) МПК

C07K 14/195 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A61P 3/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/195 (2022.05); C12N 1/20 (2022.05); A61K 35/741 (2022.05); A23L 33/135 (2022.05); A61P 3/00 (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2021112440, 11.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.10.2019

Дата регистрации:
01.08.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.10.2018 KR 10-2018-0121137;
10.10.2019 KR 10-2019-0125670

(45) Опубликовано: 01.08.2022 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 11.05.2021

(86) Заявка РСТ:
KR 2019/013402 (11.10.2019)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2020/076136 (16.04.2020)

Адрес для переписки:
125009, Москва, а/я 332, ООО "Инэврика"

(72) Автор(ы):

КО, Кван Пё (KR),
ЮН, Хё Син (KR),
ЧО, Чон Хван (KR),
Ю, Хён Чу (KR),
НАМ, Тхэ Ук (KR)

(73) Патентообладатель(и):

КОБИОЛАБС, ИНК. (KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014075745 A1, 22.05.2014.

PLOVIER H. ET AL. A purified membrane
protein from Akkermansia muciniphila or the
pasteurized bacterium improves metabolism in
obese and diabetic mice. Nat Med. 2017

Jan;23(1):107-113. doi: 10.1038/nm.4236. Найдено
онлайн: [https://spiral.imperial.ac.uk/bitstream/10044/1/42901/2/](https://spiral.imperial.ac.uk/bitstream/10044/1/42901/2/105810_2_merged_1477067399.pdf)

105810_2_merged_1477067399.pdf Дата (см.
прод.)

(54) Штамм Akkermansia muciniphila и его применение

(57) Реферат:

Изобретение относится к применению белка B2UM07, содержащего аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, для подавления аппетита у субъекта с пониженным GLP-1 гормоном и для предупреждения или лечения нарушений метаболизма, связанных с GLP-1 гормоном. Также предложены фармацевтические композиции и продукты

здорового питания, содержащие указанный белок B2UM07 в качестве действующего вещества. Белок B2UM07 обеспечивает высокую способность к индукции GLP-1, способность к поддержанию гомеостаза глюкозы в организме и влияние на снижение массы тела. 6 н. и 14 з.п. ф-лы, 12 ил., 11 пр.

(56) (продолжение):

обращения 30.09.2021. DAO M.C. ET AL. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. Gut 2016;65:426-436. Найдено онлайн: <https://gut.bmj.com/content/gutjnl/65/3/426.full.pdf> Дата обращения 30.09.2021. УРСОБА Н.И.

Метаболический синдром и метаболически ассоциированные заболевания пищеварительной системы.

R U 2 7 7 7 0 6 8 C 1

R U 2 7 7 7 0 6 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01)*C12N 1/20* (2006.01)*A61K 35/741* (2015.01)*A23L 33/135* (2016.01)*A61P 3/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/195 (2022.05); *C12N 1/20* (2022.05); *A61K 35/741* (2022.05); *A23L 33/135* (2022.05); *A61P 3/00* (2022.05)

(21)(22) Application: **2021112440**, 11.10.2019

(24) Effective date for property rights:
11.10.2019

Registration date:
01.08.2022

Priority:

(30) Convention priority:
11.10.2018 KR 10-2018-0121137;
10.10.2019 KR 10-2019-0125670

(45) Date of publication: **01.08.2022** Bull. № 22(85) Commencement of national phase: **11.05.2021**

(86) PCT application:
KR 2019/013402 (11.10.2019)

(87) PCT publication:
WO 2020/076136 (16.04.2020)

Mail address:
125009, Moskva, a/ya 332, OOO "Inevrika"

(72) Inventor(s):

KO, Gwang Pyo (KR),
YOON, Hyo Shin (KR),
CHO, Chung Hwan (KR),
YOU, Hyun Ju (KR),
NAM, Tae Wook (KR)

(73) Proprietor(s):

KOBIOLABS, INC. (KR)(54) **STRAIN OF AKKERMANSIA MUCINIPHILA AND APPLICATION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to an application of protein B2UM07 containing an amino acid sequence with SEQ ID NO: 2 for suppressing appetite in a subject with reduced hormone GLP-1 and for preventing or treating metabolic disorders associated with hormone GLP-1. Also proposed are pharmaceutical compositions

and healthy nutrition products containing said protein B2UM07 as an active substance.

EFFECT: protein B2UM07 provides a high capacity for GLP-1 induction, a capacity for maintaining the glucose homeostasis in the body, and an impact on weight loss.

20 cl, 12 dwg, 11 ex

[ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ]

Перекрестная ссылка на родственную(ые) заявку(и)

Настоящая заявка испрашивает преимущество на основании корейской патентной заявки № 10-2018-0121137, поданной 11 октября 2018 г., и корейской патентной заявки № 10-2019-0125670, поданной 10 октября 2019 г. в Ведомство по интеллектуальной собственности Республики Корея, каждая из которых включена в настоящий документ путем отсылки.

Настоящее изобретение относится к штамму *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP), эффективному в отношении подавления аппетита и профилактики, лечения, купирования, улучшения состояния и лечения нарушений метаболизма, а также к применению указанного штамма.

[ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ]

Ожирение является состоянием, при котором в организме человека накапливается избыточное количество жира в результате изменений в привычках питания, например, высококалорийной диеты, отсутствия физических упражнений и т. д.; ожирение ассоциируется с развитием диабета 2-го типа, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней печени и различных онкологических заболеваний, следовательно, имеет большое клиническое значение. С другой стороны, известно, что кишечные микроорганизмы тесно связаны с нарушениями метаболизма, такими как ожирение и диабет, в частности, наблюдался рост штамма *Akkermansia muciniphila* в кишечнике мышей, получавших противодиабетический препарат метформин, а также улучшение гомеостаза глюкозы при введении этого штамма мышам, получавшим питание с высоким содержанием жиров, поэтому данный штамм привлекает внимание, как потенциальное средство против ожирения, и представляет новую парадигму в исследованиях средств против ожирения.

Были проведены различные исследования, направленные на раскрытие механизма действия штамма *Akkermansia muciniphila* в отношении ожирения, эффективность которого против ожирения была проверена среди кишечных микроорганизмов, близко к 10-кратному общему числу человеческих клеток, однако в ходе обычных исследований основное внимание уделялось относящимся к ожирению показателям, таким как снижение веса, хроническое метаболическое воспаление, восстановление поврежденных барьеров или улучшение уровня липидов в крови.

Тем не менее, действие против ожирения имеет различные механизмы в дополнение к вышеупомянутому индикатору, и в частности, недавно сообщалось, что бурый жир взаимодействует с кишечными микроорганизмами в связи с механизмом гомеостаза, поддерживающим температуру тела. Жировая ткань разделяется на белую жировую ткань, сохраняющую энергию в виде триглицеридов, и бурую жировую ткань, выделяющую энергию в виде тепла; бурая жировая ткань приводит к потреблению энергии через тканеспецифические факторы UCP-1 и, таким образом, действует для регулирования гомеостаза глюкозы и повышения чувствительности к инсулину.

Между тем, глюкагоноподобный пептид (GLP-1), регулирующий аппетит гормон, секретируется в подвздошной кишке при приеме пищи, что повышает насыщение, регулирует аппетит и индуцирует выделение инсулина из поджелудочной железы, тем самым регулируя уровни глюкозы в крови.

GLP-1 выделяется из L-клеток, которые представляют собой разновидность кишечных эндокринных клеток, присутствующих в подвздошной и толстой кишке.

Известно, что GLP-1 обладает терапевтическим эффектом при диабете, ожирении, сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваниях, а также при воспалении

нервных клеток (Salcedo I et al., Neuroprotective and neurotrophic actions on glucagon-like peptide-1 (GLP-1): an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *British Journal of Pharmacology* (2012) 166, 1586-1599), терапевтическим эффектом при атеросклерозе (Burgmaier M et al., Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and its split products GLP-1(9-37) and GLP-1(28-37) stabilize atherosclerotic lesions in apoe^{-/-} mice. *Atherosclerosis* (2013) 231, 427-435), и так далее.

Кроме того, GLP-1 участвует в демонстрации терапевтического действия при диабете, стимулируя глюкозозависимую секрецию инсулина поджелудочной железой, усиливая экспрессию гена инсулина, проявляя воздействие на пролиферацию бета-клеток поджелудочной железы, воздействие на выживание бета-клеток поджелудочной железы, воздействие на ингибирование секреции глюкагона, снижая уровень глюкозы в крови и т. п., и участвует в демонстрации терапевтического действия при ожирении, замедляя скорость опорожнения желудка, подавляя аппетит, повышая насыщение и снижая количество принимаемой пищи. Кроме того, GLP-1 проявляет терапевтический эффект при сердечно-сосудистых заболеваниях за счет защиты кардиомиоцитов от местной ишемии и усиления сердечной функции больных с риском сердечного приступа (Sokos, G.G. et al., Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure. *J. Card. Fail.* (2006) 12: 694-699., Ban, K., et al., Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide-1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide-1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* (2008) 117: 2340-2350.).

Известно, что секреция GLP-1 стимулируется активацией TGR5 и GPR119, которые являются разновидностью G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR) (Reimann, F., et al., Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.* (2008) 8: 532-539; Lauffer, L.M., et al., GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* (2009) 58:1058-1066), или активацией α-густдудина (Jang, H.J., et al., 2007. Gut expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceeding of the National Academy of Science* 104, 1506915074.). В частности, известно, что активация G-белок-сопряженного рецептора (GPCR) TGR5 (GPR131), экспрессированного в бурой жировой ткани и мышцах, увеличивает расход энергии и, таким образом, проявляет терапевтический эффект при ожирении, что связано с положительной динамикой при заболевании печени (Lieu T et al., GPBA: A G protein-coupled receptor for bile acids and an emerging therapeutic target for disorders of digestion and sensation. *British Journal of Pharmacology* (2013), в печати), также сообщалось о подавлении артериосклероза (Pols TWH et al., TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation. *Cell Metabolism* (2011) 14, 747).

Кроме того, триглицериды, чрезмерно накапливаемые у пациентов с ожирением, находятся не только в жировых тканях, но и в печени или мышцах, что приводит к инсулинорезистентности. Поэтому расходование избыточно накапливаемых триглицеридов может быть профилактикой и лечением ожирения как основного заболевания и связанных с ним нарушений метаболизма. Адипоциты в широком смысле делятся на белые адипоциты, бурые адипоциты и бежевые адипоциты. Белые адипоциты находятся в больших жировых глобулах триглицеридов, в основном находятся в брюшной полости, и, как известно, играют негативную роль для здоровья. Сообщалось, что бурые адипоциты содержат больше митохондрий и малых жировых глобул по сравнению с белыми адипоцитами и могут вырабатываться при поддержании температуры тела путем тепловыделения и подходящих физических нагрузок. Повышение количества бурых адипоцитов у мышей оказалось эффективным в

отношении ожирения и нарушений метаболизма, так как приводило к снижению веса и увеличению потребления энергии при ожирении, вызванном питанием с высоким содержанием жиров. Кроме того, бурые адипоциты экспрессируют большое количество белка UCP-1 (разобщающий белок-1), который, как известно, играет решающую роль в производстве тепла с потреблением калорий вместо накопления калорий в адипоцитах. Помимо бурых адипоцитов, важна роль бежевых адипоцитов. Бежевые адипоциты получают из вредных для здоровья белых адипоцитов при стимуляции, такой как физические упражнения или воздействие холода, проявления белых адипоцитов снижаются, но они переходят в проявления бурых адипоцитов, что приводит к увеличению экспрессии UCP-1. Известно, что такие бежевые адипоциты также полезны при ожирении и нарушениях метаболизма подобно бурым адипоцитам у мышей.

[Литература по известному уровню техники]

1. Патент Кореи № 10-1809172

2. Опубликованная заявка на патент Кореи № 10-2015-0133646

[ПОДРОБНОЕ РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

[Техническая задача]

При данных обстоятельствах, имея целью эффективную профилактику и лечение нарушений метаболизма, авторы настоящего изобретения обнаружили, что *Akkermansia muciniphila* усиливает фактор UCP-1, влияющий на активность бурого жира, и индуцирует секрецию GLP-1 как регулирующего аппетит гормона в тонком кишечнике при использовании стандартного штамма *Akkermansia muciniphila* (Akk; Американская коллекция типовых культур, номер доступа ATCC BAA-835), применяемого в настоящее время в исследованиях средств против ожирения, и изолированного штамма *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа: KCTC13530), выделенного из фекалий здоровых корейцев.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что этот путь индуцируется в зависимости от цитокина IL-6 хозяина, и в конечном итоге выделили штамм *Akkermansia muciniphila*, способствующий индукции секреции GLP-1 в механизме борьбы с ожирением, культуральный раствор, бактериальную клетку, супернатант, экстракт или фракцию штамма, или целевой белок, выделенный из штамма, тем самым завершая изобретение.

[Техническое решение]

В качестве одного из аспектов поставленная задача решена штаммом *Akkermansia muciniphila* (Akk) SNUG-61027 с номером доступа KCTC 13530BP. Ниже приведена информация о штамме.

Наименование депонирующей организации: Корейский научно-исследовательский институт биологических наук и биотехнологий

Номер доступа: KCTC 13530BP

Дата доступа: 25 мая 2018 г.

Штамм, согласно настоящему изобретению, содержит 16S рДНК, состоящую из нуклеотидной последовательности с SEQ ID NO (идентификационным номером): 1.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для подавления аппетита или профилактики, купирования или лечения нарушений метаболизма, содержащая штамм *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP), или его культуральный раствор в качестве действующего вещества.

Под «культуральным раствором» в смысле настоящего документа понимают раствор среды в целом, содержащий штамм, его метаболит, дополнительные питательные

вещества и т. п., полученные путем культивирования штамма в течение определенного периода времени в среде, способной обеспечивать питательные вещества таким образом, чтобы штамм *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP) мог расти и выживать *in vitro*, причем это понятие включает в себя все бесклеточные супернатанты, экстракты и фракции культуры. Жидкость, полученная удалением клеток из культурального раствора, также называют «супернатантом» (надосадочной жидкостью); супернатант можно получить путем отстаивания культурального раствора в течение некоторого времени и отделением только верхнего слоя жидкости без осажженной части в нижнем слое, путем удаления бактериальных клеток фильтрацией или центрифугированием культурального раствора с целью удаления осадка в нижней части и отбора только жидкости в верхней части.

Под «бактериальной клеткой» понимают собственно штамм согласно данному изобретению, в частности собственно штамм, изолированный и выделенный из ферментированного продукта, или штамм, выделенный из культурального раствора, полученного путем культивирования изолированного штамма. Бактериальные клетки можно получить центрифугированием культурального раствора для получения осажженной в нижнем слое части или выдержкой культурального раствора в течение определенного периода времени с последующим удалением жидкости в верхней части, так как клетки осаждаются в нижнем слое культурального раствора под действием силы тяжести.

Далее, экстракт культурального раствора штамма, бактериальных клеток или супернатанта *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP) согласно данному изобретению может представлять собой, экстракт, экстрагированный этилацетатом (EtOAc) или этанолом (этиловым спиртом; EtOH), но не ограничиваясь этим. Кроме того, фракция культурального раствора, бактериальных клеток или супернатанта штамма *Akkermansia muciniphila* SNUG -61027, согласно данному изобретению, может представлять собой фракцию, полученную, фракционированием экстракта этилацетата метанолом, но не ограничиваясь этим. Фракция культурального раствора, супернатанта или экстракта штамма *Akkermansia muciniphila* (номер доступа KCTC 13530BP), согласно данному изобретению, может быть получена обычным методом фракционирования, хорошо известным из уровня техники, например, хроматографическим методом с использованием анионообменной колонки, эксклюзионной колонки и т. п.

Под «нарушением метаболизма» в смысле настоящего документа понимают одно, два или более расстройств при различных заболеваниях, таких как нарушение толерантности к глюкозе, диабет, жировая дегенерация печени, гипертония, дислипидемия, ожирение, сердечно-сосудистый атеросклероз и т. п., вызываемых хроническими нарушениями метаболизма у одного и того же человека. Например, нарушение метаболизма может представлять собой любое заболевание из ряда: нарушение толерантности к глюкозе, диабет, атеросклероз, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, жировая дегенерация печени, сердечно-сосудистое заболевание или ожирение.

Согласно данному изобретению, индукция повышенного уровня IL-6, повышенная секреция GLP-1 и повышенная активность бурого жира могут оказывать благоприятное воздействие при нарушениях метаболизма, а также предотвращают, облегчают состояние или лечат нарушения метаболизма.

В другом варианте осуществления данного изобретения предложена фармацевтическая композиция для подавления аппетита или предупреждения,

нормализации или лечения нарушений метаболизма, содержащая белок B2UM07, состоящий из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2 в качестве действующего вещества.

При идентификации белка посредством анализа ЖХ/МС-МС в той части данного изобретения, которая касается эффективности, путем поиска совпадения с обычным штаммом в базе данных NCBI был идентифицирован белок B2UM07 и получена следующая информация.

Ген: Amuc_1631

UniProtKB - B2UM07

Название белка — С-терминальная протеаза

Организм: *Akkermansia muciniphila*

Белок B2UM07 может быть получен из штамма *Akkermansia muciniphila*, в частности, штаммом *Akkermansia muciniphila* может быть SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP).

Помимо белка, состоящего из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, другие варианты последовательности также считаются входящими в защищаемый объем настоящего изобретения. К таким вариантам относится белок, состоящий из аминокислотной последовательности или кодируемой нуклеотидной последовательностью аминокислотной последовательности, функциональные характеристики которой аналогичны аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2 несмотря на изменение нуклеотидной или аминокислотной последовательности. В частности, белок согласно настоящему изобретению может содержать аминокислотную последовательность, обладающую сродством с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 2 не менее 70 %, предпочтительно не менее 80 %, более предпочтительно не менее 90 % и наиболее предпочтительно не менее 95 %.

Кроме того, данным изобретением предложен ген, кодирующий белок B2UM07. Ген согласно данному изобретению включает, соответственно, как геномную ДНК, так и кДНК, кодирующие белок B2UM07. Предпочтительно, ген может содержать кодирующую белок нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 2.

Кроме того, в объем настоящего изобретения входят различные варианты нуклеотидной последовательности. В частности, варианты генов могут содержать нуклеотидную последовательность, обладающую сродством с нуклеотидной последовательностью с SEQ ID NO: 2 не менее чем 60 %, предпочтительно не менее 70 %, более предпочтительно не менее 80 % и наиболее предпочтительно не менее 90 %.

Другим аспектом настоящего изобретения предложен рекомбинантный вектор, содержащий ген, кодирующий белок B2UM07 согласно настоящему изобретению. Термин «рекомбинантный» в смысле данного документа относится к клетке, в которой клетка реплицирует гетерогенную нуклеиновую кислоту, экспрессирует нуклеиновую кислоту или экспрессирует пептид, гетерологичный пептид или белок, кодируемый гетерологичной нуклеиновой кислотой. Рекомбинантная клетка может экспрессировать гены или сегменты генов клетки, отсутствующие в клетках в естественном состоянии, в смысловой или в антисмысловой форме. Далее, рекомбинантная клетка может экспрессировать гены, присутствующие в клетках в естественном состоянии, но ген модифицируется и повторно вводится в клетку искусственными средствами.

Под «вектором» понимают фрагмент(ы) ДНК или молекулы нуклеиновой кислоты, доставляемые внутрь клетки. Вектор может реплицировать ДНК и независимо воспроизводиться в клетках хозяина. Далее, данным изобретением предложен трансформант, трансформированный рекомбинантным вектором. В качестве метода

трансформации вектора в кишечную палочку (*E. coli*), можно использовать метод, широко известный в уровне техники, такой как использование компетентной клетки с применением буфера CaCl_2 , электропорации и теплового шока. В качестве метода культивирования трансформированной *E. coli* можно использовать широко применяемый метод культивирования *E. coli*.

Фармацевтическая композиция согласно данному изобретению может быть введена млекопитающим, в том числе человеку, различными способами. Под «введением» в смысле настоящего документа понимают введение заранее определенного вещества в тело индивидуума с использованием любого подходящего метода, а способ введения может быть любым из способов, обычно используемых в уровне техники, например, вещество может вводиться перорально, наружно, внутривенно, внутримышечно, подкожно и т. д., при этом предпочтительным является пероральный прием.

Фармацевтическая композиция, согласно данному изобретению, после изготовления может быть использована в препаратах для перорального применения, например, в порошках, гранулах, таблетках, капсулах, суспензиях, эмульсиях или сиропах, или в препаратах, предполагающих иной способ применения, например, мазях, аэрозолях, трансдермальных препаратах, суппозиториях или стерильных растворах для инъекций, в соответствии с обычным способом. Фармацевтическая композиция, согласно данному изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически подходящие и физиологически приемлемые адъюванты, такие как носители, вспомогательные вещества, разбавители и т. д.

Носители, вспомогательные вещества и разбавители, которые могут содержаться в фармацевтической композиции согласно данному изобретению, могут представлять из себя лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло. При изготовлении препарата может использоваться разбавляющий агент или вспомогательное вещество, такое как часто используемые наполнители, эмульгаторы, связующие, увлажняющие вещества, средства для улучшения распадаемости и поверхностно-активные вещества.

В одном из конкретных вариантов осуществления данного изобретения, предусматривающем применение фармацевтической композиции для людей, фармацевтическая композиция может вводиться отдельно, но с учетом способа введения и стандартной фармацевтической практики, в общем случае она может быть введена в смеси с выбранным фармацевтическим носителем. Например, композиция, содержащая штамм *Akkermansia muciniphila* согласно данному изобретению, может приниматься перорально, интрабуккально или сублингвально в форме таблетки, содержащей крахмал или лактозу, в форме капсулы, содержащей только действующее вещество согласно настоящему изобретению или вспомогательное вещество в дополнение к действующему веществу, или в форме эликсира или суспензии, содержащей химический агент для придания аромата или цвета.

Доза фармацевтической композиции, согласно данному изобретению, может зависеть от возраста, веса и пола пациента, лекарственной формы, состояния пациента и тяжести заболевания, и может вводиться один или несколько раз в день, отдельными дозами через определенные интервалы времени в соответствии с указанием врача или фармацевта. Например, суточная доза может составлять от 0,1 до 500 мг/кг, предпочтительно от 0,5 до 300 мг/кг, исходя из содержания действующего вещества.

Приведенные выше дозы усреднены и могут увеличиваться или уменьшаться в зависимости от индивидуальных особенностей.

В другом варианте осуществления данного изобретения предложено функциональное здоровое питание для подавления аппетита или нормализации или облегчения состояния при нарушениях метаболизма, содержащее штамм *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP) или культуральный раствор, супернатант, экстракт или фракцию этого штамма в качестве действующего вещества.

Нарушением метаболизма может являться нарушение толерантности к глюкозе, диабет, атеросклероз, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, жировая дегенерация печени, сердечно-сосудистое заболевание или ожирение.

Согласно данному изобретению, могут быть индуцированы повышенный уровень IL-6, повышенная секреция GLP-1 и повышенная активность бурого жира, способные оказывать благоприятное воздействие при нарушениях метаболизма, а также обеспечить облегчение состояния или лечение нарушений метаболизма.

Кроме того, настоящим изобретением предложено функциональное здоровое питание для подавления аппетита, нормализации или облегчения состояния при нарушениях метаболизма, содержащее в качестве действующего вещества белок B2UM07, состоящий из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

Нарушением метаболизма может являться нарушение толерантности к глюкозе, диабет, атеросклероз, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, жировая дегенерация печени, сердечно-сосудистое заболевание или ожирение.

Белок B2UM07 может быть получен из штамма *Akkermansia muciniphila*, в частности, штаммом *Akkermansia muciniphila* может быть SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP), детальная информация о котором приведена выше.

Функциональное здоровое питание может представлять собой различные напитки, ферментированное молоко, пищевые добавки и т. п.

Содержание штамма *Akkermansia muciniphila* как действующего вещества в функциональном здоровом питании не ограничено специальным образом и может соответствующим образом изменяться в зависимости от формы продукта питания, предполагаемого использования и т. п., например, его можно добавлять к продуктам питания в количестве от 0,01% до 15% от общей массы, а композиция напитка для здорового питания может быть добавлена в количестве от 0,02 г до 10 г, предпочтительно от 0,3 г до 1 г на 100 мл.

Для напитков в составе здорового питания согласно данному изобретению не предусмотрены специальные ограничения на состав жидкости, за исключением того, что в состав должен входить штамм *Akkermansia muciniphila* в качестве обязательного ингредиента в указанном соотношении, а также могут присутствовать различные вкусоароматические добавки или природные углеводы как дополнительные ингредиенты, подобно обычным напиткам.

Примерами вышеупомянутых натуральных углеводов могут быть обычные сахараиды, такие как моносахаридаы, например глюкоза, фруктоза и т. п., дисахаридаы, например, мальтоза, сахароза и т. п., и полисахаридаы, например декстрин, циклодекстрин и т. п., и сахарные спирты, такие как ксилитол, сорбитол, эритритол и т. п. В качестве ароматизаторов, помимо упомянутых выше, можно использовать натуральные вкусовые вещества (тауматин, экстракт стевии (например, ребаудозид А, глицирризин и др.) и синтетические вкусовые добавки (сахарин, аспартам и др.). Содержание натурального углевода в 100 мл композиции согласно данному изобретению обычно составляет примерно от 1 до 20 г, предпочтительно примерно от 5 до 12 г.

Помимо вышеперечисленного, функциональное здоровое питание согласно данному изобретению может содержать различные питательные вещества, витамины, минералы (электролит), ароматизаторы, такие как синтетические ароматизаторы и натуральные ароматизаторы, красители и усилители вкуса (сыр, шоколад и др.), пектиновую кислоту и ее соли, альгиновую кислоту и ее соли, органические кислоты, защитные коллоидные загустители, агенты для регулирования pH, стабилизаторы, консерванты, глицерин, алкоголь, карбонизирующие агенты, используемые в газированных напитках и т. п.

Кроме того, функциональное здоровое питание, согласно данному изобретению, может включать фрукты, как используемые при приготовлении натуральных фруктовых соков и напитков с фруктовыми соками, а также растительных напитков. Эти компоненты могут использоваться по отдельности или в сочетании. Хотя доля этих добавок не имеет большого значения, она обычно выбирается из диапазона от 0 до примерно 20 массовых частей на 100 массовых частей функционального здорового питания согласно данному изобретению.

В другом варианте осуществления изобретения предложено использование штамма *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP) или культурального раствора, супернатанта, экстракта или фракции этого штамма для подавления аппетита или профилактики, лечения, нормализации или улучшения состояния при нарушениях метаболизма.

Штамм *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP), используемый для применения данного изобретения, может содержать 16S рДНК, состоящую из нуклеотидной последовательности с SEQ ID NO: 1.

Нарушением метаболизма, к которому применяется данное изобретение, может являться нарушение толерантности к глюкозе, диабет, атеросклероз, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, жировая дегенерация печени, сердечно-сосудистое заболевание или ожирение.

Кроме того, в другом варианте осуществления данного изобретения предложено использование белка B2UM07, состоящего из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, для подавления аппетита или предупреждения, лечения, улучшения или смягчения метаболических заболеваний.

Белок B2UM07, используемый для применения данного изобретения, может быть получен из штамма *Akkermansia muciniphila*.

Штамм *Akkermansia muciniphila*, используемый для применения данного изобретения, может представлять собой штамм SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP).

Настоящим изобретением предложен способ подавления аппетита или предупреждения, лечения, нормализации или облегчения состояния при нарушениях метаболизма, включающий этап лечения штаммом *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP) или культуральным раствором, супернатантом, экстрактом или фракцией этого штамма.

Штамм *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP), используемый в способе подавления аппетита или предупреждения, лечения, нормализации или облегчения нарушений метаболизма, может содержать 16S рДНК, состоящую из нуклеотидной последовательности с SEQ ID NO: 1.

Метаболическим заболеванием, к которому применяется способ согласно данному изобретению, может быть нарушение толерантности к глюкозе, диабет, атеросклероз, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, жировая дегенерация печени, сердечно-сосудистые заболевания или ожирение.

Настоящим изобретением предложен способ подавления аппетита или

предупреждения, лечения, нормализации или облегчения нарушений метаболизма, включающий этап лечения с помощью белка B2UM07, состоящего из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2.

Белок B2UM07, используемый в способе согласно данному изобретению, может быть
5 получен из штамма *Akkermansia muciniphila*.

Штамм *Akkermansia muciniphila*, используемый в способе согласно данному изобретению, может представлять собой штамм SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP)

[ПОЛЕЗНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

Настоящим изобретением подтверждено действие активации бурого жира и способность секретировать гормон регулирования аппетита GLP-1, в дополнение к снижению веса и регуляции гомеостаза глюкозы среди противодействующих ожирению эффектов *Akkermansia muciniphila*, а также подтверждено, что эти эффекты зависят от специфического цитокина IL-6 в организме хозяина. Кроме того, данным изобретением
15 определен новый штамм *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (номер доступа KCTC 13530BP) со значительно повышенной способностью к индукции GLP-1 и подтверждено, что белок B2UM07(P9), выделенный из культурального раствора штамма *Akkermansia muciniphila*, показал высокую способность к индукции GLP-1, способность к поддержанию гомеостаза глюкозы в организме и влияние на снижение массы тела.

Таким образом, новый штамм *Akkermansia muciniphila* и белок B2UM07 могут быть
20 полезны для подавления аппетита, лечения или профилактики нарушений метаболизма.

[КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ]

На ФИГ. 1 показаны результаты экспериментов по улучшению воздействия на вес печени и бурого жира после введения штамма *Akkermansia muciniphila* (Akk) в модели
25 с мышами, получающими питание с высоким содержанием жиров.

На ФИГ. 2 показаны результаты экспериментов кПЦР, подтверждающих увеличение экспрессии UCP-1 и маркеров, связанных с бурым жиром, при применении штамма *Akkermansia muciniphila*.

На ФИГ. 3 показаны результаты экспериментов кПЦР, подтверждающих увеличение
30 уровней цитокина IL-6 и GLP-1 в тонком кишечнике при применении штамма *Akkermansia muciniphila*.

На ФИГ. 4 показаны результаты экспериментов, подтверждающие, что опосредованное штаммом *Akkermansia muciniphila* проявление бурого жира и термогенеза зависят от цитокина IL-6.

На ФИГ. 5 показаны результаты экспериментов in vitro (ИФА), подтверждающие, что секреция GLP-1, обусловленная *Akkermansia muciniphila*, вызвана секретлируемым бактериями веществом.

На ФИГ. 6 показаны результаты экспериментов in vitro, подтверждающие, что секреция GLP-1, обусловленная *Akkermansia muciniphila*, вызвана элементами,
40 отличающимися от короткоцепочечной жирной кислоты (КЦЖК).

На ФИГ. 7А показаны результаты экспериментов in vitro для контроля индуцибельности GLP-1 по эксклюзионным фракциям *Akkermansia muciniphila*, а на ФИГ. 7В показаны результаты экспериментов по мониторингу секреции GLP-1 индуцирующими GLP-1 фракциями (100K, 300K) после лечения протеиназой К (PK).

На ФИГ. 8 показаны результаты экспериментов по фракционированию на анионообменной колонке и эксклюзионной колонке, индуцирующей GLP-1 фракции (100K) для индуцирующих GLP-1 фракций.

На ФИГ. 9 показан результат качественного белкового анализа индуцирующих

GLP-1 фракций (100K, m2-m4, G17-G20) *Akkermansia muciniphila* с использованием ЖХ/МС-МС.

На ФИГ. 10 показаны результаты экспериментов по мониторингу индуцибельности GLP-1 очищенными белками-кандидатами (гель SDS-PAGE).

На ФИГ. 11 показан результат эксперимента, подтверждающий способность поддерживать гомеостаз глюкозы в организме при внутривенном введении целевого белка.

На ФИГ. 12 показан результат эксперимента, подтверждающий способность поддерживать гомеостаз глюкозы в организме при пероральном введении целевого белка.

[ПОДРОБНОЕ РАСКРЫТИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

Настоящее изобретение раскрыто ниже со ссылкой на примеры. Тем не менее, эти примеры приведены только для наглядности и не ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1. Анализ действия по снижению веса печени и веса бурого жира после введения штамма *Akkermansia muciniphila* (Akk) в модели с мышами, получающими питание с высоким содержанием жиров

Штамм *Akkermansia muciniphila* (ATCC BAA-835, Akk) получен анаэробным культивированием в течение 72 часов в плотной среде с сердечно-мозговым экстрактом (ВН) с добавлением 0,5% муцина, и был создан запас. Штамм вводили ежедневно перорально 6-недельным самцам мышей C57BL/6 в концентрации 4×10^8 КОЕ/200 мкл/мышь одновременно с питанием с высоким содержанием жиров (60% жиров) (ВЖ+Akk, n=8 в группе). В качестве контрольных групп использовалась группа, получающая питание с низким содержанием жиров (10% жиров) (НЖ), и группа, получающая питание только с высоким содержанием жиров (ВЖ). Сравнение между контрольными группами и группой, в которой вводили исследуемый штамм, производилось через 14 недель. После 16 часов без пищи отбирали жировую ткань и печеночную ткань, и измеряли вес ткани (ФИГ. 1А).

В результате было подтверждено, что не произошло существенного изменения веса ингуинальной белой жировой ткани (igWAT) и эпидидимальной белой жировой ткани (EpiWAT) в группе ВЖ+Akk по сравнению с группой ВЖ, однако вес межлопаточной бурой жировой ткани (iBAT) значительно уменьшился. Кроме того, при проведении корреляционного анализа бурой жировой ткани (iBAT) и массы печеночной ткани с массой тела ФИГ. 1В) было подтверждено, что вес бурой жировой ткани и печеночной ткани были в значительной степени пропорциональны массе тела, тем самым, снижение веса бурого жира и печени показало возможные ткани-мишени для *Akkermansia muciniphila*.

Кроме того, при сравнении размера жира в бурой жировой ткани и печеночной ткани по группам путем окрашивания гематоксилин-эозином (ГЭ), было отмечено, что размер адипоцитов бурой жировой ткани и печеночной ткани были значимо снижены в группе *Akkermansia muciniphila* по сравнению с контрольной группой (ФИГ. 1С и D).

Таким образом, в результате эксперимента было подтверждено, что *Akkermansia muciniphila* способствует снижению веса бурой жировой ткани, размера адипоцитов, а также веса печеночной ткани (ФИГ. 1А~1D).

Пример 2. Увеличение экспрессии UCP-1 и маркеров бурого жира при применении штамма *Akkermansia muciniphila*

Бурую жировую ткань (iBAT) подвергали иммуногистохимическому окрашиванию (ИГХ), после чего сравнивали уровни разобщающего белка (UCP-1), являющегося

маркером активации бурого жира, между группами (ФИГ. 2А). После выделения тканевой РНК и синтеза кДНК с помощью кПЦР была подтверждена экспрессия гена UCP-1, а также маркеры дифференцировки бурого жира (CIDEA, PRDM16, PPARGC1 α , Апельин) (ФИГ. 2В).

5 В результате эксперимента было подтверждено, что маркеры бурого жира в бурой жировой ткани оказались существенно выше у мышей, получавших питание с высоким содержанием жира и *Akkermansia muciniphila*, по сравнению с группой, не получавшей *Akkermansia muciniphila*, причем повышение также было подтверждено окрашиванием тканей с фактором UCP-1, связанным с активностью бурого жира. Таким образом, был
10 подтвержден механизм индуцирования бурой жировой ткани под действием *Akkermansia muciniphila*.

Пример 3. Повышение уровней цитокина IL-6 и GLP-1 в подвздошной и толстой кишке под действием штамма *Akkermansia muciniphila*

После извлечения РНК из тканей подвздошной и толстой кишки и синтеза кДНК
15 сравнивали уровни экспрессии иммунных цитокиновых маркеров (TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10) между группами (ФИГ. 3А и В).

При обработке клеточной линии кишечника мышей (клетка СТ26) тремя типами *Lactobacillus* (KCTC2180, KCTC3112, KCTC1048), тремя типами *Bifidobacterium* (KCTC3127, KCTC3128, KCTC3352) или *Akkermansia muciniphila* (Akk) сравнивали возможность
20 экспрессии цитокина IL-6. В качестве положительного контроля был использован липополисахарид (ЛПС) из *E. coli* (ФИГ. 3С).

С помощью кПЦР были идентифицированы родственные гены (*gcg*, *pcsk1*, *pcsk2*), индуцирующие секрецию кишечного секретированного аппетит-регулирующего гормона, глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) в ткани подвздошной кишки (ФИГ. 3Д).

25 В результате эксперимента было подтверждено значимое повышение уровня цитокина IL-6 в клетках подвздошной и толстой кишки мышей при введении *Akkermansia muciniphila*, а также значимое повышение секреции регулирующего гормона, глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) в сыворотке (ФИГ. 3А - 3Д). В частности, линии клеток подвздошной кишки мышей показали значимо повышенные уровни IL-6
30 с *Akkermansia muciniphila* по сравнению с другими штаммами *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Пример 4. Зависимость проявления бурого жира и экзотермической реакции при использовании штамма *Akkermansia muciniphila* от цитокина IL-6

35 Проведено наблюдение на предмет зависимости эффективности активации бурых жиров под действием *Akkermansia muciniphila* от цитокина IL-6.

Для этой цели 6-недельные самцы мышей C57BL/6 дикого типа (WT) и мышей с дефицитом гена IL-6 (IL-6KO) получали питание с высоким содержанием жира (60% жира; ВЖ), соответственно, штамм вводили ежедневно внутрь в концентрации 4×10^8 КОЕ/200 мкл/мышь (N=6 в группе IL-6KO, n=8 в каждой из остальных групп). В качестве
40 контрольных использовались группы, получавшие питание с низким содержанием жиров (10%; НЖ) или питание с высоким содержанием жиров (без применения штамма). Через 14 недель сравнивали группы мышей WT и мышей IL-6KO, получавших только питание с высоким содержанием жиров и получавших штамм.

После 16 часов без пищи была отобрана бурая жировая ткань, проведена экстракция
45 РНК, синтез кДНК, а затем с помощью кПЦР подтверждена экспрессия UCP-1 (ФИГ. 4А). Ректальную температуру измеряли цифровым термометром (TESTO925) (ФИГ. 4В). Кожную температуру бурой жировой ткани измеряли тепловизором (FLIR) (ФИГ. 4С и D).

Для измерения концентрации GLP-1 в сыворотке крови, утром после отсутствия питания в течение 5 часов, перорально вводили глюкозу в концентрации 2 г/кг. Через 10 минут брали плазму с помощью пробы крови из ретро-орбитальной пазухи и помещали в охлаждаемую пробирку с добавлением 1 мкг/мл дипротина А (6019; Tocris) для предотвращения полураспада GLP-1. После центрифугирования (4000 × g, 10 мин) супернатант замораживали при температуре -80 °С. Затем определяли секрецию GLP-1 с помощью набора ИФА для GLP-1 (ФИГ. 4Е).

Гены, связанные с индуцированием секреции GLP-1 (*gcg*, *pcsk1*, *pcsk2*) в тканях подвздошной и толстой кишки, оценивали с помощью кПЦР у мышей WT и мышей IL-6KO (ФИГ. 4F~H).

В результате эксперимента экспрессия связанного с бурым жиром гена UCP-1, увеличенная за счет введения *Akkermansia muciniphila*, не была увеличена у мышей с дефицитом гена IL-6 (ФИГ. 4А). Кроме того, по результатам наблюдения за температурой поверхности кожи над областью бурой жировой ткани с помощью инфракрасной камеры или измерения ректальным термометром было подтверждено, что у мышей IL-6KO не наблюдается тепловыделения вследствие активации бурого жира (ФИГ. 4В~4D). Далее, в отличие от мышей WT, у мышей IL-6KO концентрация GLP-1 в сыворотке была скорее снижена и не наблюдалось никаких изменений в уровне генов (*gcg*, *pcsk1*, *pcsk2*), индуцирующих секрецию GLP-1, следовательно, было подтверждено, что повышенный уровень GLP-1 в аппетит-регулирующем гормоне в подвздошной кишке также зависит от IL-6 (ФИГ. 4Е~H).

Пример 5. Подтверждение связи секреции GLP-1 при использовании *Akkermansia muciniphila* с веществом, секретируемым бактериями (in vitro)

Для получения жидкой культуры штамм *Akk* (*Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835) или *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 культивировали в среде муцина 0,5%, затем в среде в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (ВН) с добавлением 0,1% или 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS) в течение 36 часов.

Линию клеток NCI-H716 (ATCC CCL-251), секретирующую GLP-1, посеяли в 96-луночный планшет с коллагеновым покрытием в концентрации 2×10^5 клеток/мл, после чего для синхронизации клеточного обмена с глюкозой между клетками клетки культивировали в течение 2 часов в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Затем бактериальный осадок штамма *Akk* (ATCC BAA-835) или *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027 (соотношение бактериальных клеток: 1:20) или бесклеточный супернатант (CFS) обрабатывали в концентрации 10% об/об. Через 2 часа получали супернатант и определяли уровень секреции GLP-1 в супернатанте с помощью комплекта ИФА (ФИГ. 5А). Для контроля зависящей от концентрации эффективности секреции GLP-1, супернатант штамма SNUG-61027 обрабатывали в концентрации от 10 до 100 % об/об, или супернатант *Bifidobacterium bifidum* (KBL483; изолированный штамм, полученный из фекалий корейцев) в роли контроля (con), обрабатывали в концентрации 10-100% об/об, как указано выше; после 2 часов обработки получали супернатанты и наблюдали секрецию GLP-1 в супернатанте (ФИГ. 5В).

Эксперимент показал, что когда линию клеток, индуцирующих GLP-1 (L-клетки), подвергали обработке живыми бактериальными клетками и супернатантом *Akkermansia muciniphila*, GLP-1 не обнаруживался в случае обработки живыми бактериями, в то время как при обработке супернатантом наблюдалась сильная секреция GLP-1, и уровень секреции был значительно повышен при обработке штаммом SNUG 61027 по сравнению с ATCC BAA-835 (ФИГ. 5А). Далее, при обработке супернатантом культуры штамма

SNUG-61027 уровень секреции GLP-1 повышался в зависимости от дозы (ФИГ. 5B).

Пример 6. Подтверждение связи секреции GLP-1 *Akkermansia muciniphila* с другими факторами, помимо короткоцепочечных жирных кислот (in vitro)

Для анализа короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), секретированных *Akkermansia muciniphila*, с помощью ГХ-МС наблюдали за выработкой репрезентативных короткоцепочечных жирных кислот, ацетата, пропионата и бутирата (ФИГ. 6A). Через два часа после обработки ацетатом, пропионатом (1 мм, 10 мм) и супернатантом культуры штамма (100 % об/об) контролировали уровень секреции GLP-1 (ФИГ. 6B).

В результате эксперимента было подтверждено, что *Akkermansia muciniphila* секретирует ацетат и пропионат (ФИГ. 6A). Тем не менее, количество GLP-1, индуцированного ацетатом и пропионатом, было значительно ниже количества GLP-1, индуцированного супернатантом культуры *Akkermansia muciniphila* (ФИГ. 6B). Таким образом, установлено участие иного элемента, отличающегося от ацетата и пропионата, в производстве GLP-1, индуцированного *Akkermansia muciniphila*.

Пример 7. Фракционирование и идентификация индуцирующей GLP-1 фракции (100K) с помощью эксклюзионного фильтра, анионообменной колонки и эксклюзионной колонки

Для выделения активного вещества в культуральном растворе были получены фракции с помощью эксклюзионных фильтров. После концентрирования мониторинг индуцирования GLP-1 подтвердил достижение высокого уровня секреции GLP-1 с фракцией 100-300 кДа. Кроме того, для удаления белка из эффективных фракций (100K~300K, 30K~100K) протеиназу К (РК) в концентрации 100 мкг/мл обрабатывали при 55 °С в течение 1 часа, с последующей инактивацией при 90 °С в течение 10 минут, после чего измеряли секрецию GLP-1. В результате было подтверждено, что секреция GLP-1 не индуцировалась фракцией с удаленным белком. Таким образом, было подтверждено, что секреция GLP-1 индуцируется белком во фракции. Для рефракционирования 100 кДа ~ 300 кДа (100K) фракции супернатанта *Akkermansia muciniphila*, была выполнена жидкостная хроматография быстрого разрешения (FPLC) на белках с использованием анионообменной колонки MonoQ (MonoQ 5/50, GE Healthcare) и системы АКТАexplorer (GE Healthcare). При этом ввели 80 мкг/мл фракции 100K и фракционировали образец со скоростью 1 мл/мин. Затем каждую фракцию обрабатывали L-клетками и измеряли уровень секреции GLP-1. В результате эксперимента было подтверждено, что GLP-1 секретировался в высокой концентрации фракциями m2-m4 (ФИГ. 8A).

Затем фракции m2-m4 концентрировали с помощью фильтра 30K, концентрированный образец повторно подвергали процедуре FPLC с использованием эксклюзионной колонки ГПХ (ГПХ/SEC). Для фракционирования образец фракционировали со скоростью 3 мл/мин с помощью системы АКТАexplorer HiLoad 16/600 Superdex pg (GE Healthcare). Аналогичным образом, каждая фракция обрабатывалась L-клетками, и была подтверждена возможность секреции GLP-1. В результате эксперимента было подтверждено, что GLP-1 секретируется до высокого уровня фракциями G17-G20 (ФИГ. 8B).

Пример 8. Качественный анализ индуцируемой фракции белка GLP-1 (100K, m2-m4, G17-G20) *Akkermansia muciniphila* с использованием ЖХ/МС-МС

Образец 1) концентрат 100K, образец 2) концентрат MonoQ и образец 3) концентрат ГПХ, полученные из супернатанта *Akkermansia muciniphila*, были качественно проанализированы с помощью ЖХ/МС-МС. Были исключены белки бычьего происхождения, которые могут находиться в базальной среде супернатанта, и отслежено

количество белков, идентифицированных в каждой фракции.

Для этого каждый образец, полученный через эксклюзионные фильтры, был подвергнут качественному анализу, в концентрате ГПХ было выявлено 10 типов белков или пептидов, которые считались конечным концентратом, они были ранжированы по интенсивности и сравнены с уровнями проявления в других фракциях. Для анализа использовали ЖХ-МС/МС (нанопотоковый масс-спектрометр Easy-NLC 100/Q Exactive). Обработка проведена с помощью программного обеспечения Maxquant 1.5, аннотирование выполнено с использованием базы данных белков Universal Protein Resource (Uniprot) для качественного анализа белков. Из общего количества белков и пептидов были выбраны только имеющие уровень ложноположительных результатов <1%.

В результате эксперимента в образце 3 было обнаружено 10 белков фракции G17-G20, где ожидалась наибольшая концентрация белка-кандидата (ФИГ. 9А и В).

Пример 9. Подтверждение индукции GLP-1 полностью очищенным белком-кандидатом

В клетках *E. coli* BL21 было клонировано и экспрессировано 10 белков из концентрированной фракции *Akkermansia muciniphila*, после чего была проведена очистка каждого белка. Один (бета-галактозидаза) из 10 белков был исключен из следующих этапов, поскольку не удалось клонировать эффективный экспрессионный вектор. Затем экспрессию и очистку 9 белков проверили с помощью SDS-PAGE. В качестве положительного контроля использовали Amuc1100 – белок, производный от *Akkermansia muciniphila*, который, как известно, обладает противодействующими ожирению свойствами (Plovier H. et al., A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med.* (2017) 23: 107-113). Каждый из изолированных белков был обработан на L-клетках для подтверждения секреции GLP-1.

С этой целью синтезированные гены целевых белков были введены в плазмиду pET-21b (Novagen) с индуцируемым промотором изопропилтиогалактозида, а белки очищены с использованием гистидиновой метки. Это подтверждено гелем SDS-PAGE. Масштабное производство и очистка белков были обеспечены благодаря трансформации штамма BL21 *Escherichia coli* с синтезированной плазмидой и культивированием, а белки были обработаны на клеточной линии NCI-H716 после количественного анализа концентрации.

В результате эксперимента было подтверждено, что секреция GLP-1 была индуцирована белками B2UKW8 (P1), B2URM2 (P5), и B2UM07 (P9), в частности, что белок B2UM07 индуцирует GLP-1 значительно сильнее белка Amuc1100 при 10 мкг/мл и 100 мкг/мл (ФИГ. 10С).

Пример 10. Подтверждение способности целевого белка к гомеостазу глюкозы в организме (нормальная диета, внутрибрюшинное введение)

Чтобы подтвердить, что целевой белок улучшает способность к гомеостазу глюкозы в организме, белки P1 (B2UKW8), P5 (B2URM2) и P9 (B2UM07) вводили внутрибрюшинно мышам на нормальной диете в течение недели в концентрации 100 мкг/мышь, после чего проводили тесты на толерантность к глюкозе.

С этой целью 3 эффективных белка (P1, P5, P9) вводили внутрибрюшинно мышам на нормальной диете в концентрации 100 мкг/200 мкл ежедневно, а на 7-й день вес тела сравнивали с группой без введения белков (n=8/группа, Фиг. 11С), спустя 14 дней после введения перорально вводили глюкозу в концентрации 2 г/кг и измеряли уровень глюкозы в крови от 15 до 120 минут в качестве теста на толерантность к глюкозе (ФИГ. 11А и 11В).

В результате эксперимента было подтверждено, что в группе, где вводился белок Р9 (B2UM07), поддерживался значительно более низкий уровень сахара в крови, чем в других группах. Было показано, что он более эффективен, чем белок Amuc1100, полученный из *Akkermansia muciniphila*, который, как известно, способствует

5 толерантности к глюкозе. Р1 (B2UKW8) и Р5 (B2URM2) показали только тренд толерантности к глюкозе, тем не менее, в случае группы Р9 также было подтверждено значимое снижение веса (ФИГ. 11С).

Пример 11. Подтверждение способности целевого белка к гомеостазу глюкозы в организме (питание с высоким содержанием жиров, пероральное введение)

10 Чтобы подтвердить улучшение способности к гомеостазу глюкозы в организме идентифицированным целевым белком, мышам, получавшим питание с высоким содержанием жиров, вводили белок Р9 (B2UM07) в концентрации 100 мкг/мышь в течение 8 недель, после чего проводили тесты на толерантность к глюкозе. Уровень глюкозы в крови измеряли в течение 15–120 минут после перорального введения

15 глюкозы (2 г/кг).

В результате эксперимента в группе с введением Р9 (B2UM07) наблюдался значительный эффект ингибирования увеличения веса по сравнению с группой мышей, получавших питание с высоким содержанием жиров, причем эффект был выше, чем в группе с введением Amuc1100 (ФИГ. 12А). Кроме того, было подтверждено, что через

20 30 минут после введения глюкозы способность к гомеостазу глюкозы значительно изменялась по сравнению с группой мышей, получавших питание с высоким содержанием жиров (ФИГ. 12В и 12С).

<110> КОБИОЛАБС, ИНК.

<120> Штамм *Akkermansia muciniphila* и его применение

25 <130> OPP20201536KR

<150> KR 2018/0121137

<151> 2018-10-11

<150> KR 2019/0125670

<151> 2019-10-10

30 <160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 918

<212> DNA

35 <213> Unknown

<220>

<223> *Akkermansia muciniphila* SNUG-61027

<400> 1

```

gctaataatt ctctagtggc gcacgggtga gtaacacgtg agtaacctgc ccccgagagc 60
40 gggatagccc tgggaaactg ggattaatac cgcatagtat cgaaagatta aagcagcaat 120
gcgcttgggg atgggctcgc ggcctattag ttagttggtg aggtaacggc tcaccaaggc 180
gatgacgggt agccggtctg agaggatgtc cggccacact ggaactgaga cacgggtccag 240
acacctacgg gtggcagcag tcgagaatca ttcacaatgg gggaaaccct gatggtgcga 300
cgccccgtgg gggaatgaag gtcttcggat tgtaaaccct tgtcatgtgg gagcaaatta 360
45 aaaagatagt accacaagag gaagagacgg ctaactctgt gccagcagcc gcggtataac 420
agagggtctca agcgttggtc ggaatcactg ggcgtaaaagc gtgcgtaggc tgtttcgtaa 480
gtcgtgtgtg aaaggcgcgg gctcaaccgg cggacggcac atgatactgc gagactagag 540
taatggaggg ggaaccggaa ttctcgggtg agcagtgaag tgcgtagata tcgagaggaa 600

```

cactcgtggc gaaagcgggt tcctggacat taactgacgc ttaggcacga aggccagggg 660
 agcgaaaggg attagatacc cctgtagtcc tggcagtaaa cgggtgcacgc ttgggtgtgcg 720
 gggaatcgac cccctgcgtg ccggaactaa cgcgttaagc gtgccgcccg ggggagtacg 780
 gtcgcaagat taaaactcaa agaaattgac ggggacccgc acaagcgggtg gaattatgtg 840
 5 gcttaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctgggcttg acatgtaatg aacaacatgt 900
 gaaagcatgc gactcttc 918
 <210> 2
 <211> 748
 <212> PRT
 10 <213> Unknown
 <220>
 <223> Akkermansia muciniphila B2UM07 Cytoplasmic__Membrane (Amuc_1631)
 <400> 2
 Met Glu Lys Asn Ala Pro Phe Ser Val Met Asn Met His Ser Phe Arg
 15 1 5 10 15
 Trp Ile Arg Leu Thr Ala Phe Ser Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ile Thr
 20 20 25 30
 Ser Cys Ala Ser Ala Ala Thr Asp Phe Asn Gln Val Gly Lys Gln Met
 35 40 45
 20 Ser Leu Leu Leu Gln Asn Phe His Phe Ser Arg Lys Glu Phe Ser Asp
 50 55 60
 Glu Leu Ser Thr Lys Phe Leu Glu Thr Tyr Leu Arg Lys Val Asp Pro
 65 70 75 80
 Asn Lys Ile Phe Phe Thr Gln Gln Asp Val Asp Ala Leu Lys Arg Lys
 25 85 90 95
 Tyr Gly Lys Glu Leu Asp Asp Tyr Leu Met Ser Gly Gln Met Met Asp
 100 105 110
 Ala Ala Gln Ala Met His Ala Leu Tyr Arg Gln Arg Ala Met Gln Arg
 115 120 125
 30 Ile Ser Tyr Ala Arg Asp Leu Leu Lys Lys Gly Gly Phe Thr Phe Asp
 130 135 140
 Lys Asp Lys Ser Ile Glu Arg Ser Arg Arg Lys Thr Ala Ala Trp Pro
 145 150 155 160
 Lys Asp Glu Ala Glu Met Gln Gln Val Trp Lys Asp Met Val Glu Glu
 35 165 170 175
 Gln Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Arg Glu Thr Val Ala Arg Leu Ala
 180 185 190
 Lys Glu Gln Asn Lys Pro Asp Pro Leu Ala Asn Glu Lys Pro Ala Glu
 195 200 205
 40 Glu Lys Leu Leu Met Arg Tyr Glu Arg Ile Gln Arg Asn Ile Gln Glu
 210 215 220
 Thr Asp Leu Glu Asp Val Ala Glu Thr Leu Leu Ser Ala Val Ala Leu
 225 230 235 240
 Thr Tyr Asp Pro His Thr Asp Tyr Met Gly Ala Arg Gln Val Asp Arg
 45 245 250 255
 Phe Lys Ile Ser Met Gly Thr Glu Leu Thr Gly Ile Gly Ala Leu Leu
 260 265 270
 Gly Ser Glu Asp Asp Gly Ser Thr Lys Ile Thr Gly Ile Val Val Gly

RU 2777 068 C1

		275		280		285											
		Gly	Pro	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly	Glu	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Ile	Val
		290						295					300				
		Ala	Ile	Asp	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly	Glu	Met	Val	Asp	Ile	Leu	Phe	Met
5		305					310					315					320
		Lys	Leu	Asp	Lys	Val	Val	Asp	Met	Ile	Arg	Gly	Ala	Glu	Asn	Thr	Gln
						325					330					335	
		Met	Arg	Leu	Lys	Val	Glu	Pro	Ala	Asp	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Lys	Ile
						340					345				350		
10		Ile	Thr	Leu	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Pro	Leu	Lys	Asp	Glu	Leu	Ala	Lys
						355					360				365		
		Gly	Glu	Ile	Ile	Glu	Leu	Thr	Gly	Ala	Pro	Glu	Gly	Arg	Asn	Arg	Ile
						370					375				380		
		Gly	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Phe	Tyr	Ala	Asp	Met	Glu	Gly	Gly	Asp
15		385					390					395					400
		Arg	Arg	Cys	Ala	Lys	Asp	Val	Lys	Lys	Ile	Leu	Glu	Arg	Met	Asn	Lys
						405					410					415	
		Glu	Asn	Val	Asp	Gly	Leu	Val	Ile	Asp	Leu	Arg	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly
						420					425				430		
20		Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Arg	Leu	Met	Thr	Gly	Phe	Phe	Thr	Gly	Asn	Gly
						435					440				445		
		Pro	Val	Val	Gln	Ile	Lys	Asp	Thr	Arg	Gly	Asn	Val	Asp	Ile	Lys	Ser
						450					455				460		
		Ala	His	Asn	Arg	Gln	Lys	Leu	Phe	Asn	Gly	Pro	Ile	Val	Val	Leu	Ile
25		465					470					475					480
		Asn	Lys	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Gln
						485					490					495	
		Asp	Tyr	Gly	Arg	Ala	Val	Ile	Val	Gly	Asp	Glu	Ser	Thr	Phe	Gly	Lys
						500					505				510		
30		Gly	Ser	Val	Gln	Gln	Pro	Val	Asp	Ile	Gly	Gln	Tyr	Leu	Pro	Phe	Phe
						515					520				525		
		Ala	Ala	Arg	Asp	Arg	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Val	Thr	Thr	Gln	Lys	Phe
						530					535				540		
		Tyr	Arg	Val	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Gln	Leu	Lys	Gly	Val	Glu	Ser	Asp
35		545					550					555					560
		Ile	Gln	Leu	Pro	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Phe	Glu	Leu	Gly	Glu	Asp	Ile
						565					570					575	
		Leu	Asp	Tyr	Ala	Met	Pro	Tyr	Asp	Gln	Ile	Thr	Pro	Cys	Thr	Asn	Tyr
						580					585				590		
40		Lys	Lys	Asp	Ser	Ser	Ile	Ala	Ala	Met	Leu	Pro	Val	Leu	Lys	Asp	Ala
						595					600				605		
		Ser	Ala	Lys	Arg	Val	Glu	Lys	Asp	Arg	Asp	Leu	Gln	Ile	Ala	Arg	Glu
						610					615				620		
		Asp	Ile	Ala	Met	Met	Lys	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	Asn	Lys	Leu	Ser	Leu
45		625					630					635					640
		Asn	Lys	Lys	Ile	Arg	Glu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ala	Leu	Glu	Glu	Arg	Arg
						645					650					655	
		Lys	Ser	Ile	Asn	Lys	Glu	Arg	Lys	Ile	Arg	Phe	Ala	Glu	Met	Ala	Arg

	660		665		670
	Glu Asp Ala Thr Lys Tyr Lys Ile Tyr Arg Leu Thr Leu Asp Asp Val				
	675		680		685
	Asn Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ala Asp Pro Glu Lys Asp Asn Glu Gln				
5	690		695		700
	Phe Met His Leu Ala Glu Asp Pro Thr Ala Glu Leu Asp Asp Ser Pro				
	705		710		715
	Glu Tyr Pro Ser Gly Leu Asp Pro Glu Leu Arg Glu Gly Ile Asn Ile				
		725		730	
10	Val Gln Asp Met Leu Lys Leu Glu Ser Ser Gly Lys				
	740		745		

(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения нарушений метаболизма, связанных с GLP-1 гормоном, содержащая белок B2UM07, состоящий из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, в качестве действующего вещества.
2. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения нарушений метаболизма по п. 1, причем белок B2UM07 получают из штамма *Akkermansia muciniphila*.
3. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения нарушений метаболизма по п. 2, причем штамм *Akkermansia muciniphila* представляет собой штамм SNUG-61027, имеющий номер доступа KCTC 13530BP.
4. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения нарушений метаболизма по п. 1, причем нарушением метаболизма является нарушение толерантности к глюкозе, диабет, атеросклероз, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, жировая дегенерация печени, сердечно-сосудистые заболевания или ожирение.
5. Фармацевтическая композиция для подавления аппетита у субъекта с пониженным GLP-1 гормоном, содержащая белок B2UM07, состоящий из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, в качестве действующего вещества.
6. Фармацевтическая композиция для подавления аппетита по п. 5, причем белок B2UM07 получают из штамма *Akkermansia muciniphila*.
7. Фармацевтическая композиция для подавления аппетита по п. 6, причем штамм *Akkermansia muciniphila* представляет собой штамм SNUG-61027, имеющий номер доступа KCTC 13530BP.
8. Продукт здорового питания для облегчения состояния при нарушениях метаболизма, связанных с GLP-1 гормоном, содержащий белок B2UM07, состоящий из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, в качестве действующего вещества.
9. Продукт здорового питания для облегчения состояния при нарушениях метаболизма по п. 8, в котором белок B2UM07 получают из штамма *Akkermansia muciniphila*.
10. Продукт здорового питания для облегчения состояния при нарушениях метаболизма по п. 9, при этом штамм *Akkermansia muciniphila* представляет собой штамм SNUG-61027, имеющий номер доступа KCTC 13530BP.
11. Продукт здорового питания для облегчения состояния при нарушениях метаболизма по п. 8, причем нарушением метаболизма является нарушение толерантности к глюкозе, диабет, атеросклероз, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, жировая дегенерация печени, сердечно-сосудистые заболевания или ожирение.

12. Продукт здорового питания для подавления аппетита у субъекта с пониженным GLP-1 гормоном, содержащий белок B2UM07, состоящий из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 2, в качестве действующего вещества.

13. Продукт здорового питания для подавления аппетита по п. 12, в котором белок
5 B2UM07 получают из штамма *Akkermansia muciniphila*.

14. Продукт здорового питания для подавления аппетита по п. 13, при этом штамм *Akkermansia muciniphila* представляет собой штамм SNUG-61027, имеющий номер доступа KCTC 13530BP.

15. Применение белка B2UM07, содержащего аминокислотную последовательность
10 с SEQ ID NO: 2, для предупреждения или лечения нарушений метаболизма, связанных с GLP-1 гормоном.

16. Применение для предупреждения или лечения нарушений метаболизма по п. 15, причем белок B2UM07 получают из штамма *Akkermansia muciniphila*.

17. Применение для предупреждения или лечения нарушений метаболизма по п. 16,
15 причем штамм *Akkermansia muciniphila* представляет собой штамм SNUG-61027, имеющий номер доступа KCTC 13530BP.

18. Применение белка B2UM07, содержащего аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, для подавления аппетита у субъекта с пониженным GLP-1 гормоном.

19. Применение для подавления аппетита по п. 18, причем белок B2UM07 получают
20 из штамма *Akkermansia muciniphila*.

20. Применение для подавления аппетита по п. 19, причем штамм *Akkermansia muciniphila* представляет собой штамм SNUG-61027, имеющий номер доступа KCTC 13530BP.

25

30

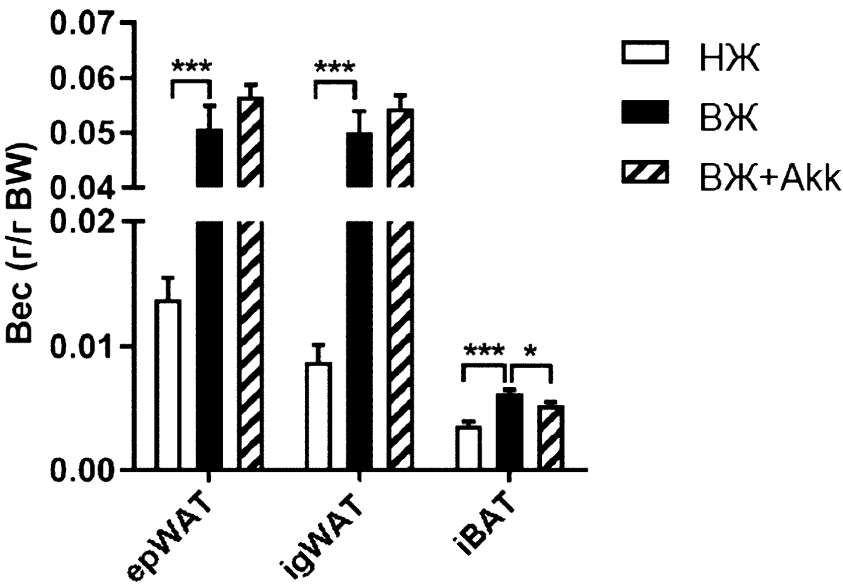
35

40

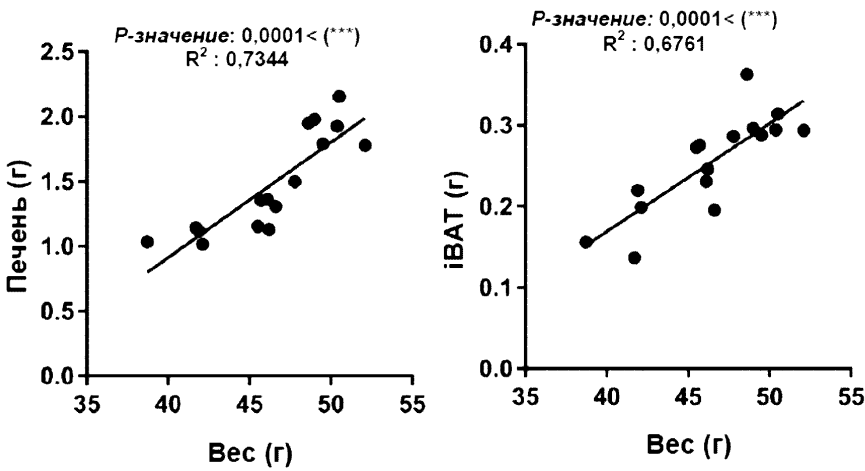
45

1

ФИГ. 1а

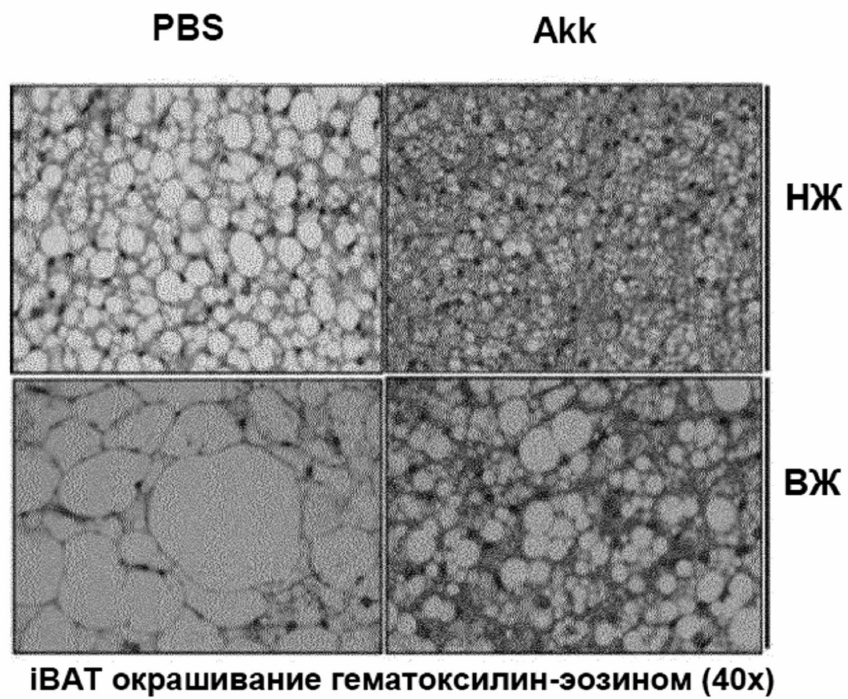


ФИГ. 1б

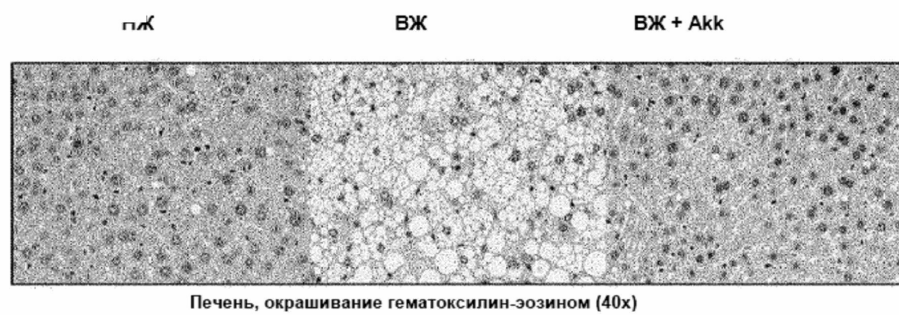


2

ФИГ. 1с



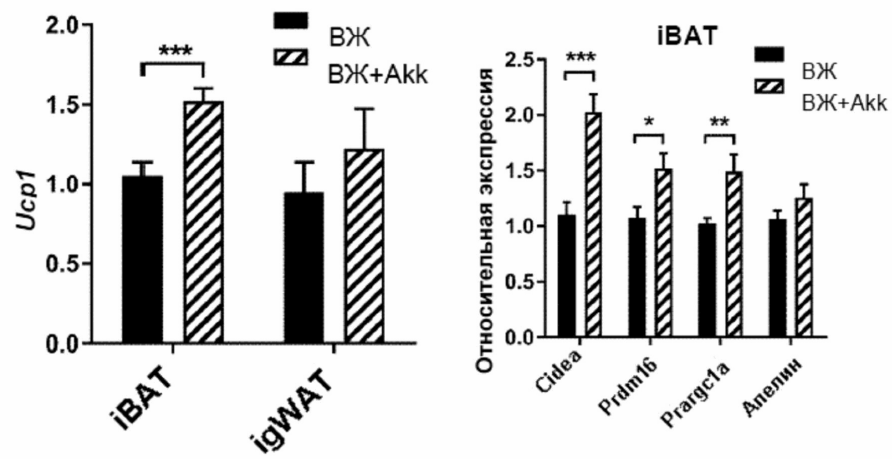
ФИГ. 1d



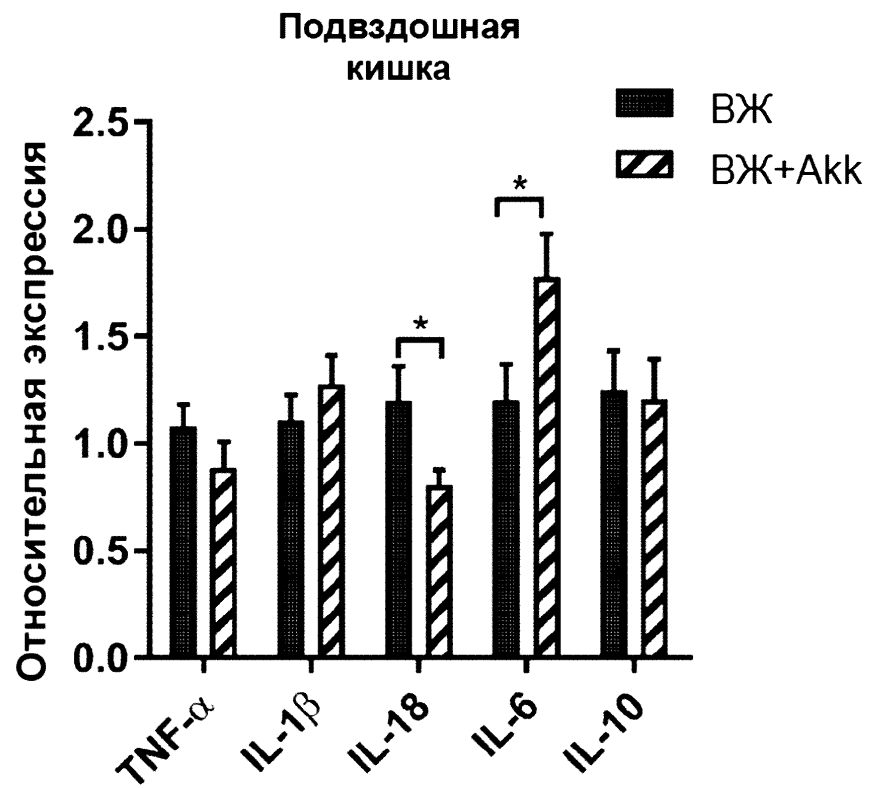
ФИГ. 2a



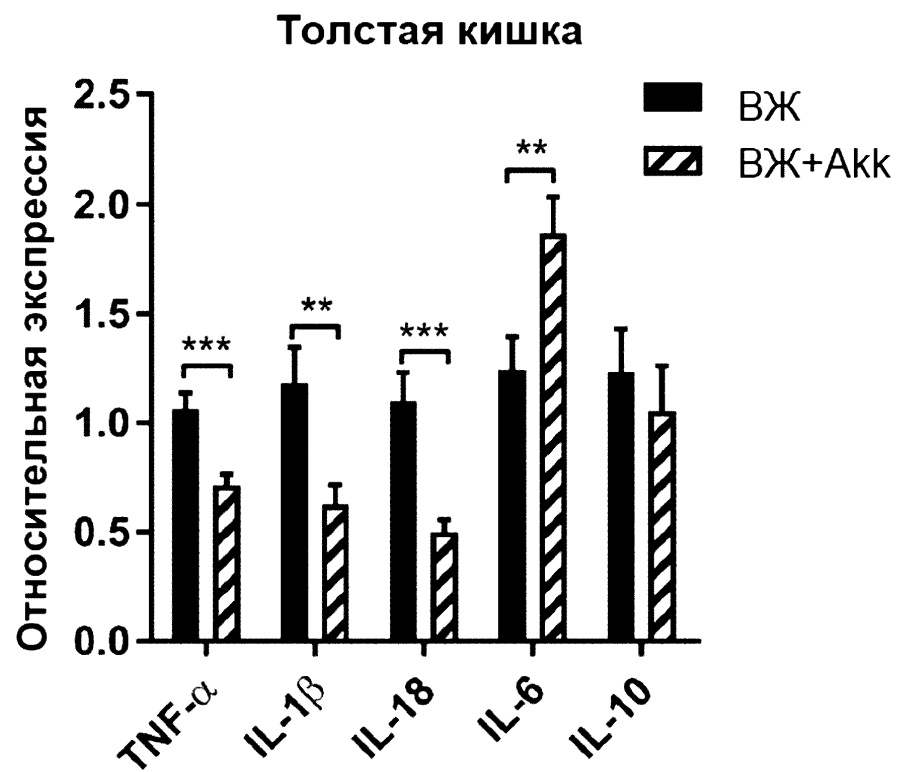
ФИГ. 2b



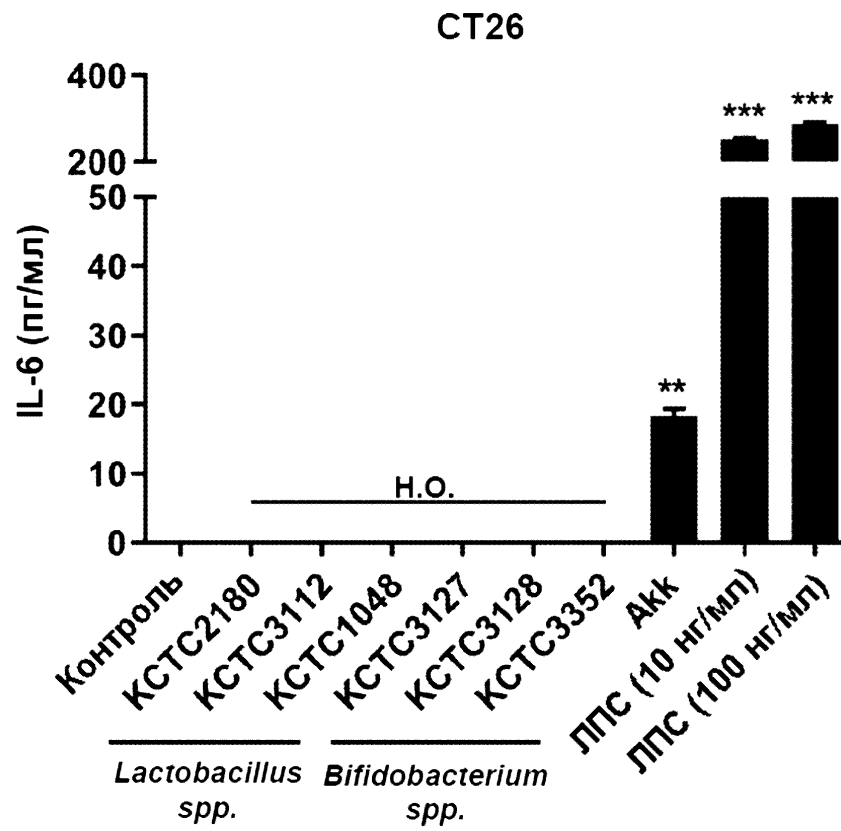
ФИГ. 3а



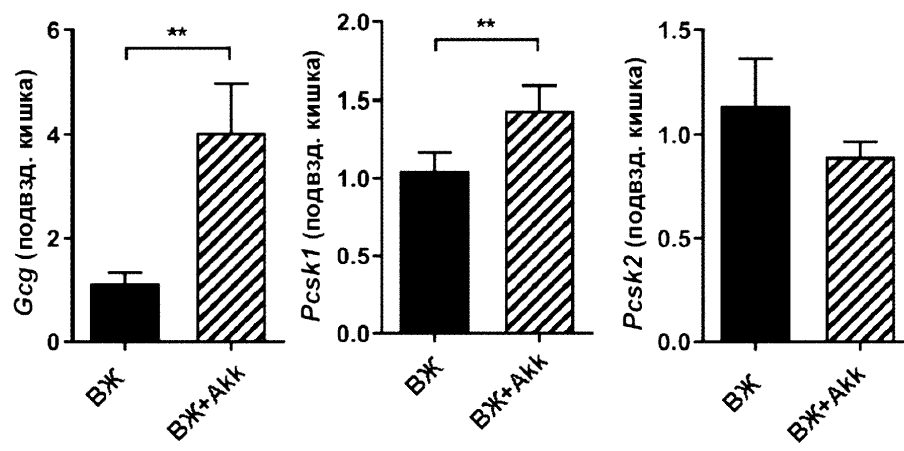
ФИГ. 3b



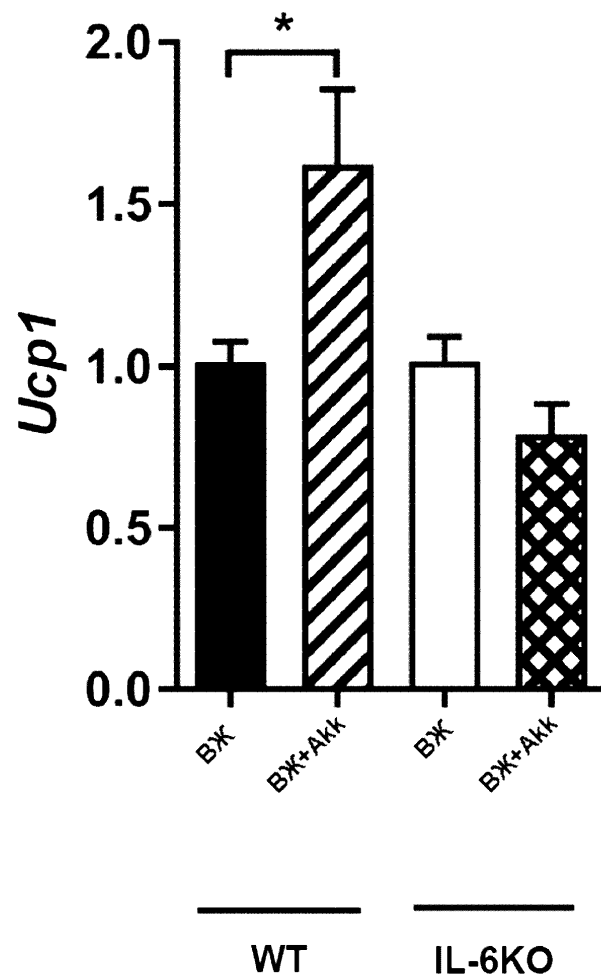
ФИГ. 3с



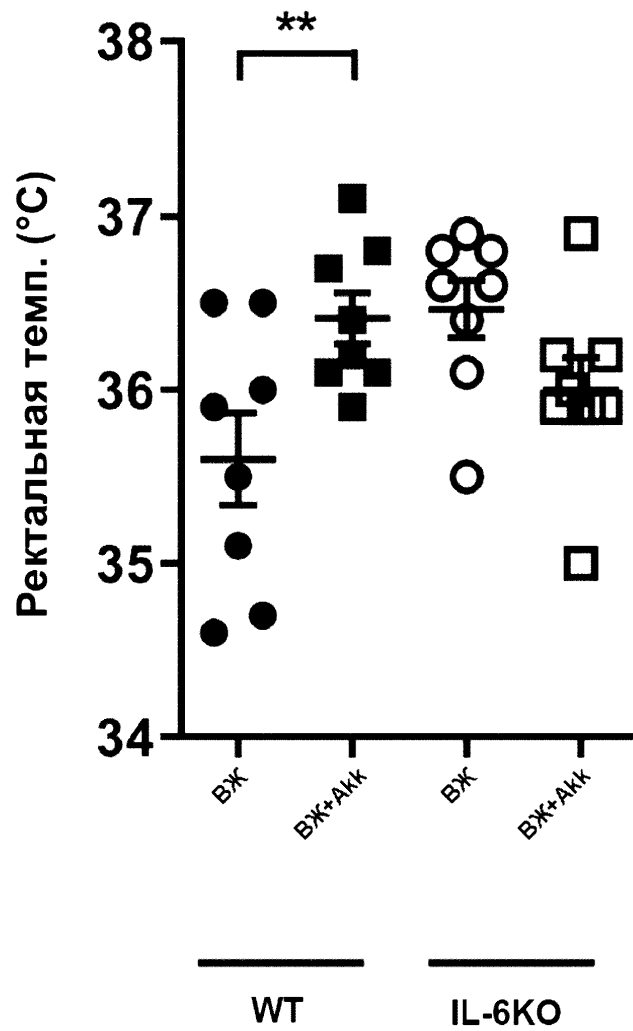
ФИГ. 3d



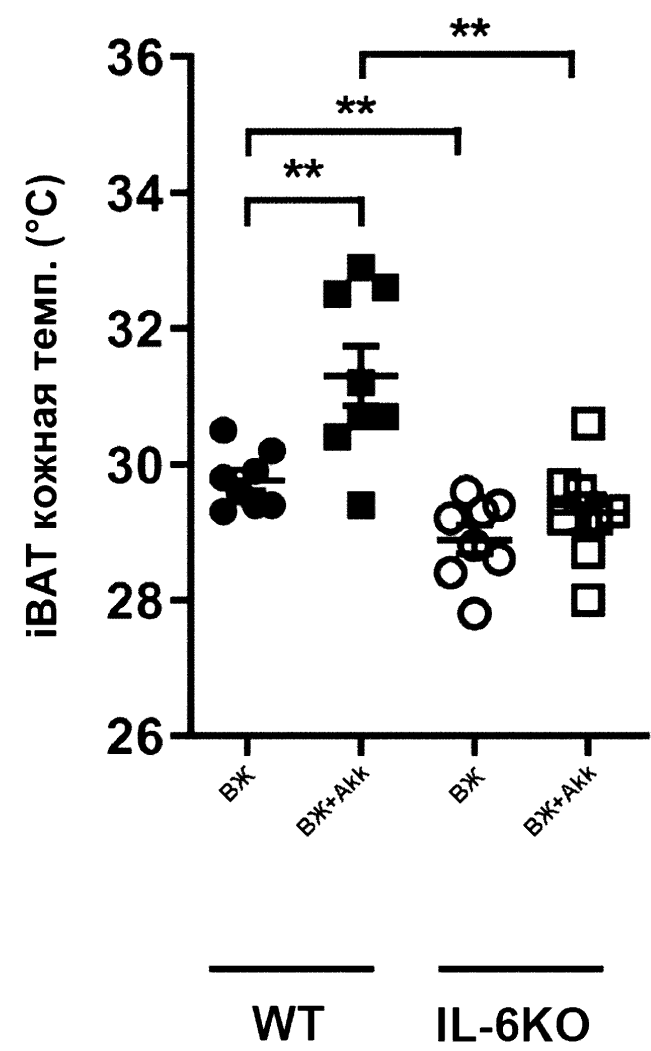
ФИГ. 4a



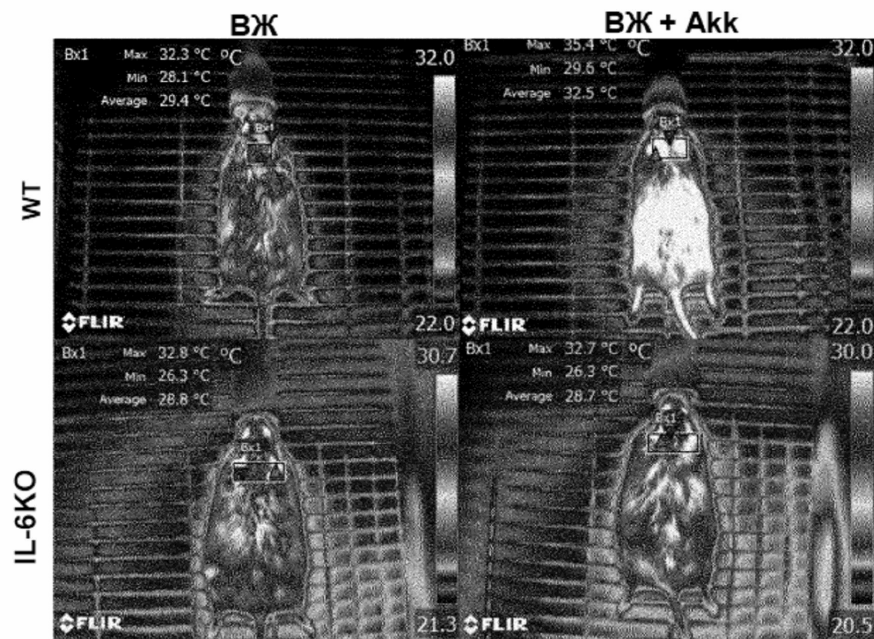
ФИГ. 4b



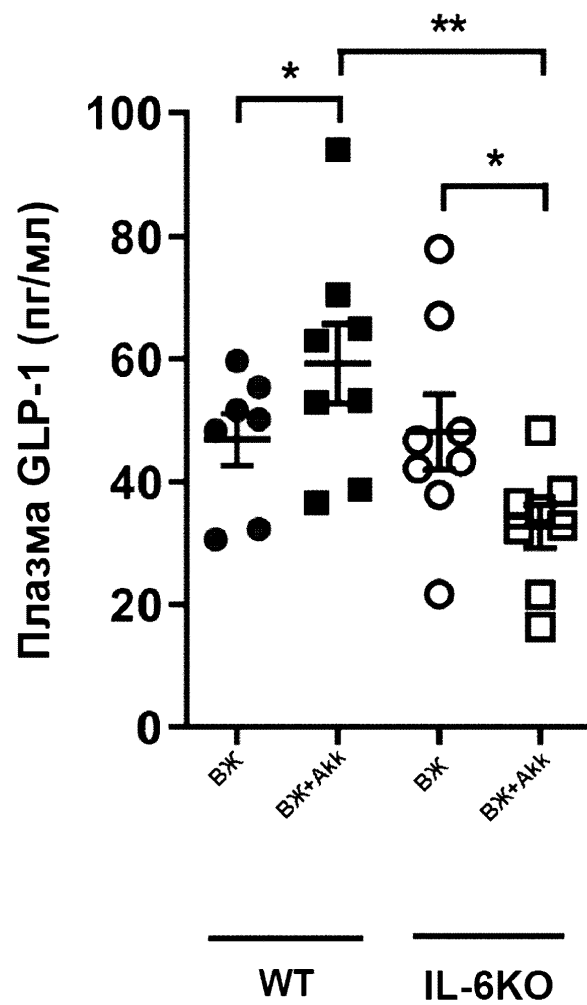
ФИГ. 4с



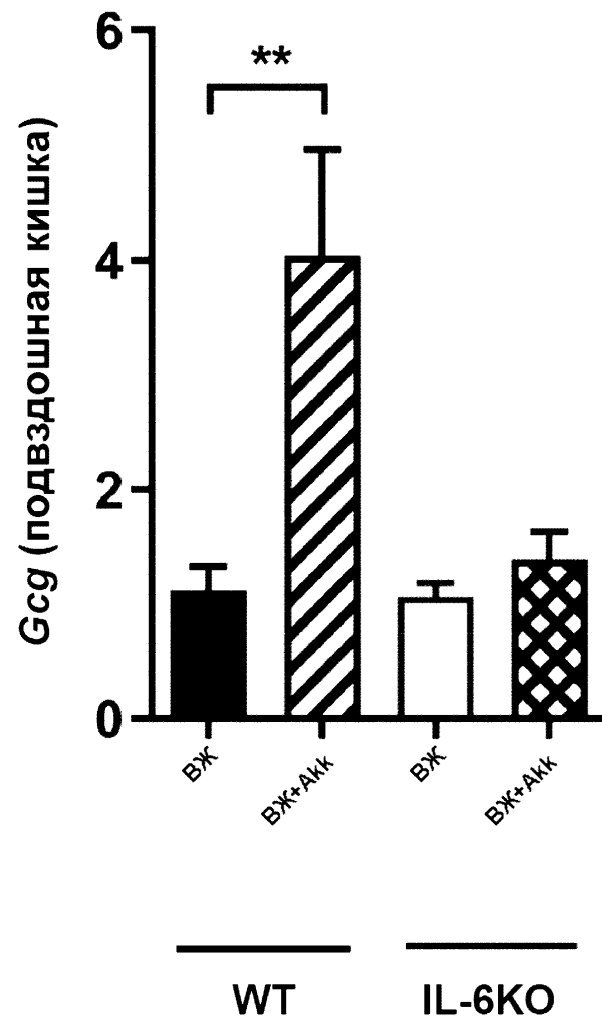
ФИГ. 4d



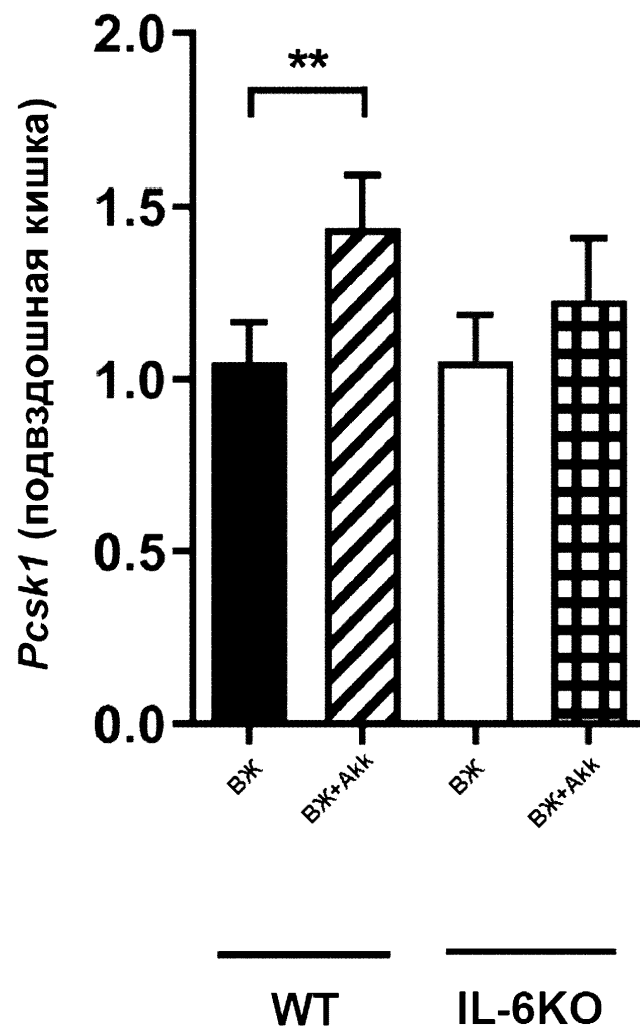
ФИГ. 4е



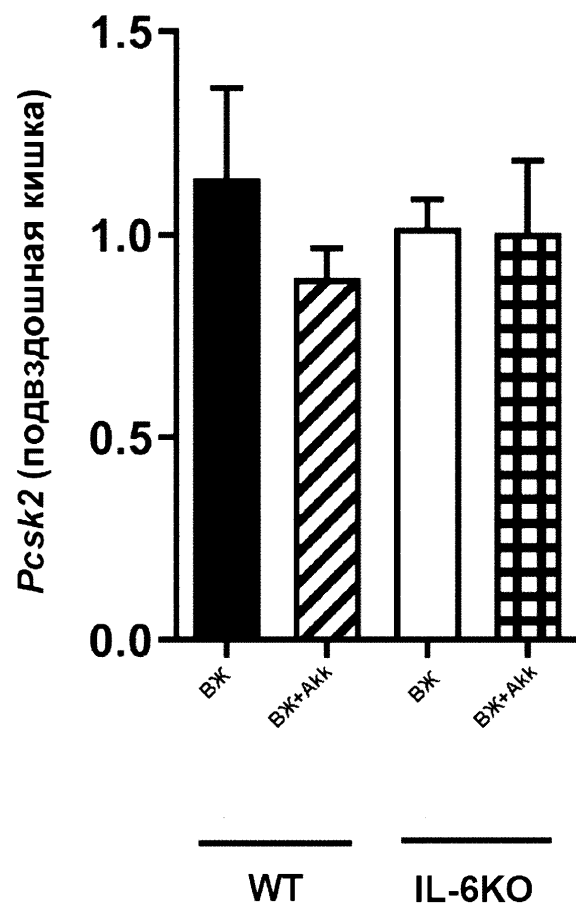
ФИГ. 4f



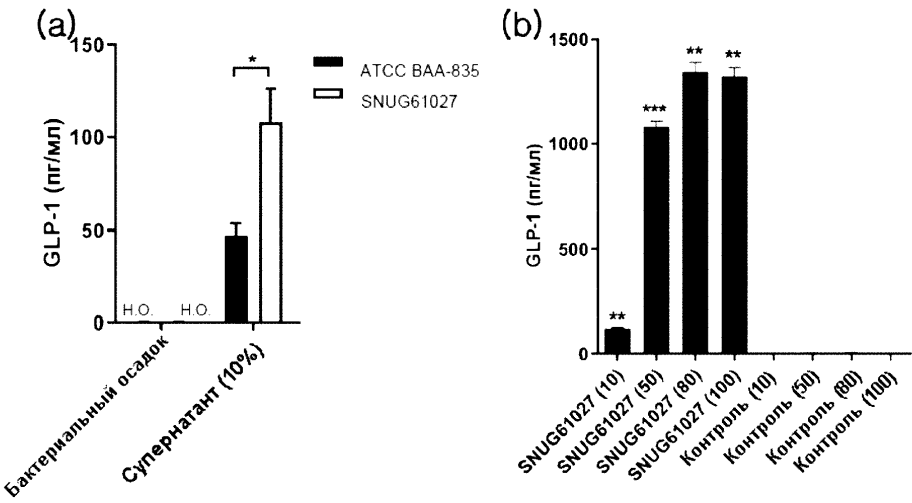
ФИГ. 4g



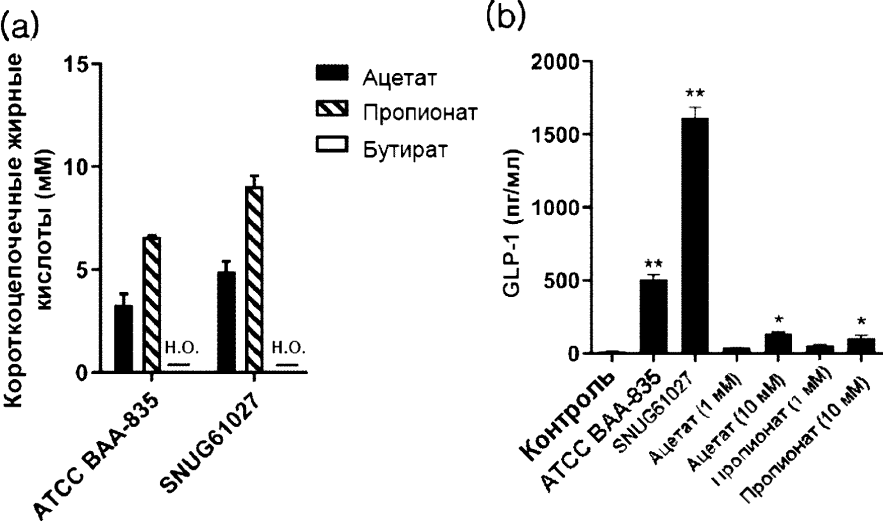
ФИГ. 4h



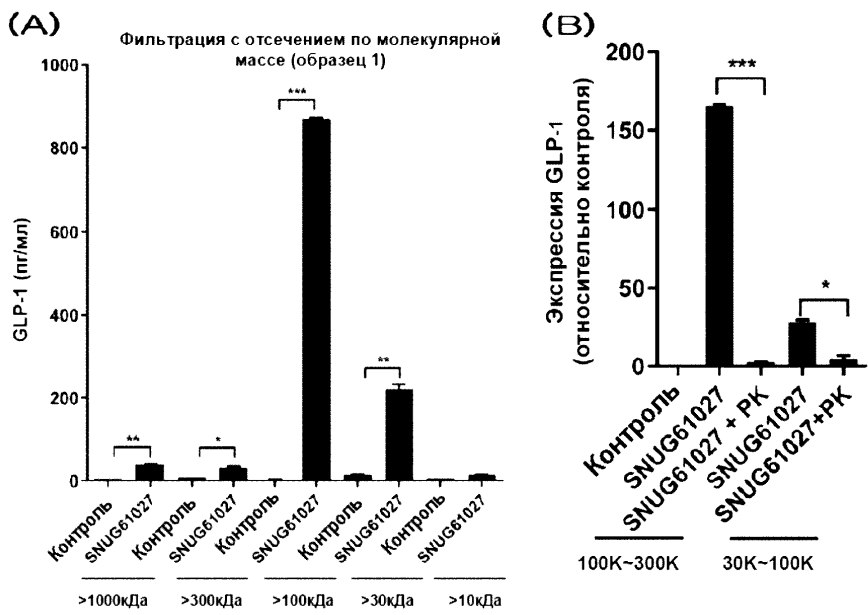
ФИГ. 5



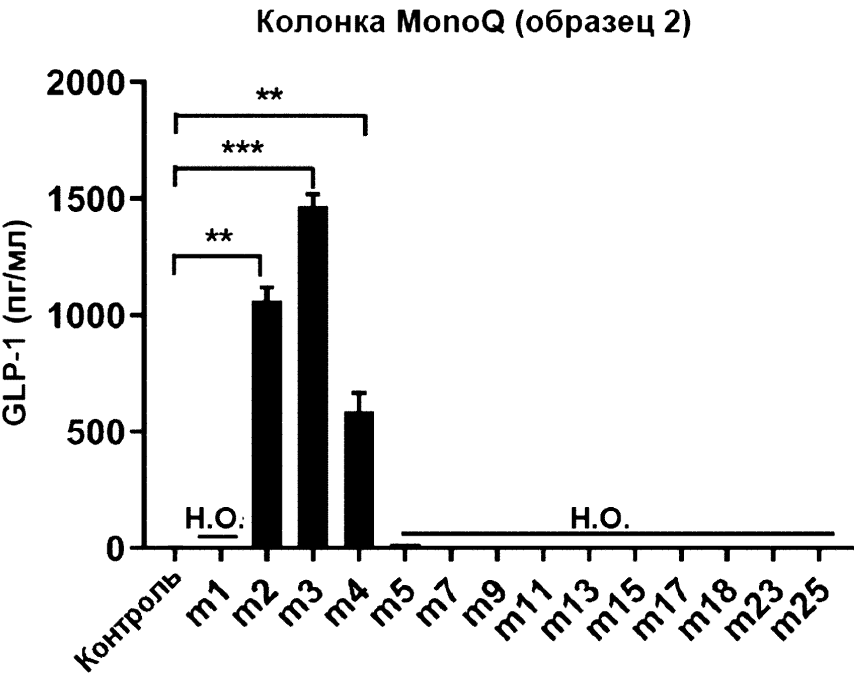
ФИГ. 6



ФИГ. 7



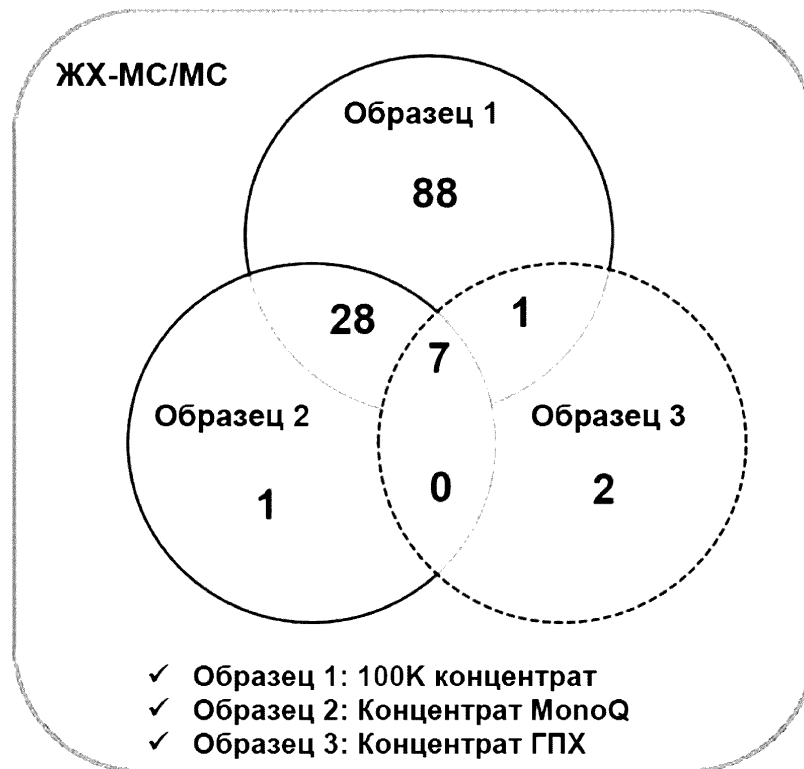
ФИГ. 8a



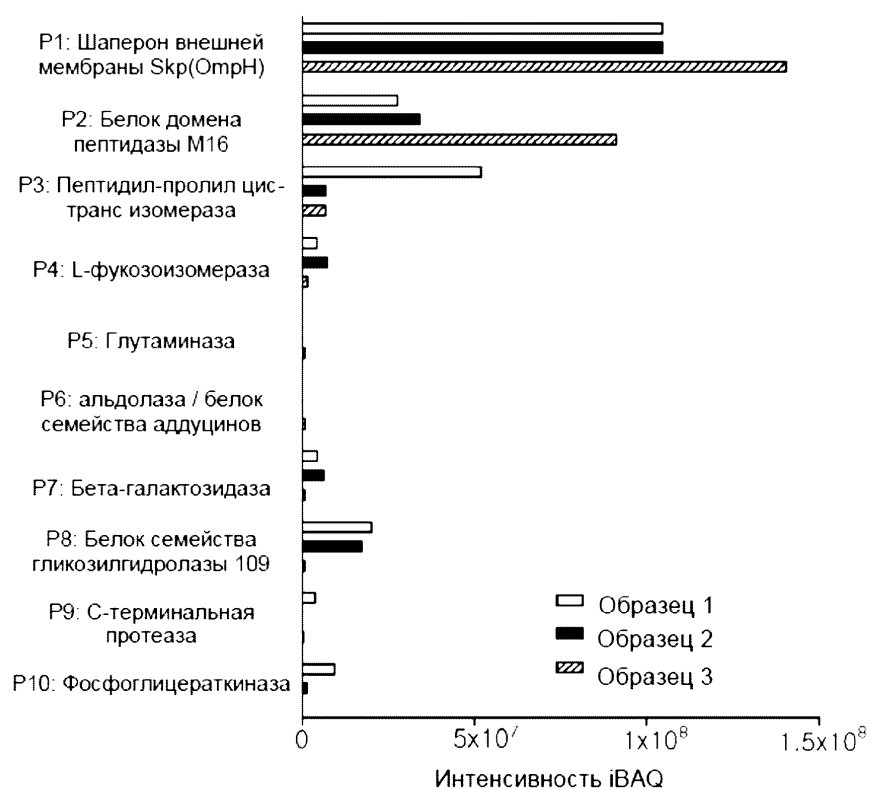
ФИГ. 8b



ФИГ. 9а



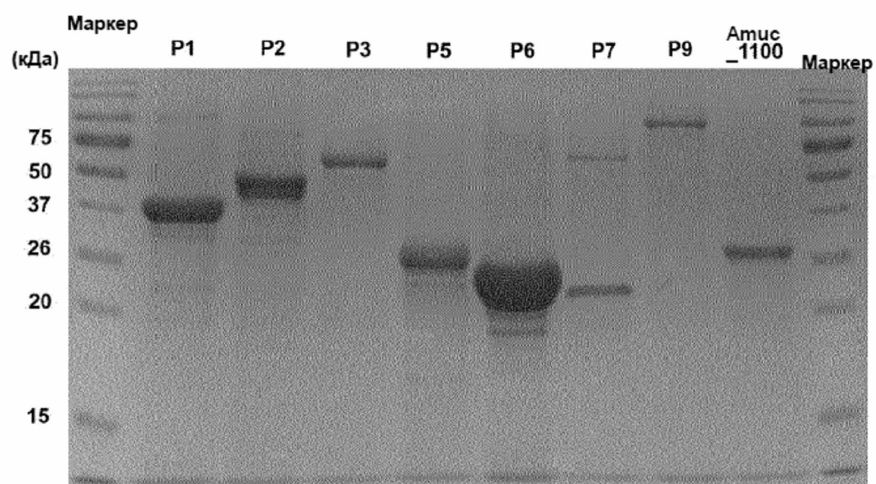
ФИГ. 9b



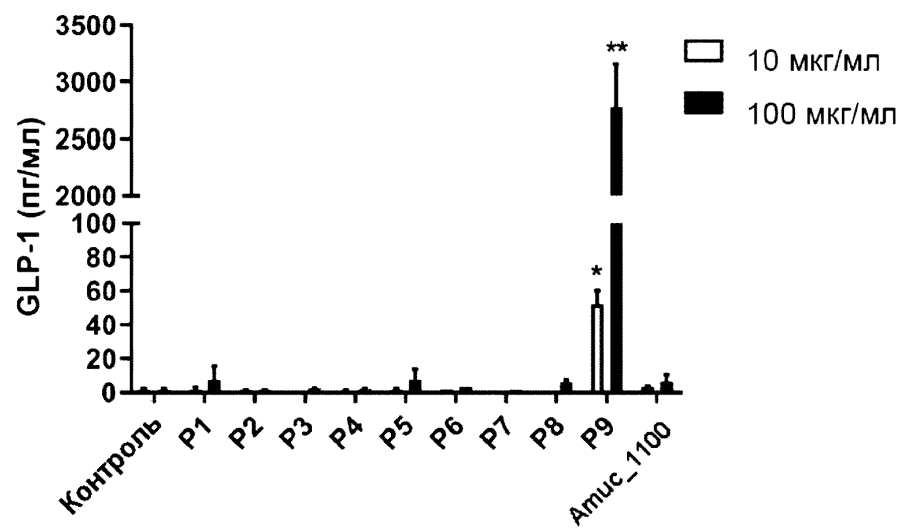
ФИГ. 10а

ID#	ID гена#	ID белка	Белок	Молекулярный вес (кДа)
P1	Amic_1418	B2UKW8	Фосфоглицераткиназа	42,692
P2	Amic_0017	B2UL75	Белок семейства гликозилгидролазы 109	53,802
P3	Amic_1832	B2UN39	L-фукозиоизомераза	64,695
P4	Amic_0405	B2UND1	Шаперон внешней мембраны Skp(OmpH)	23,491
P5	Amic_1282	B2URM2	Пептидил-пролил цис-транс изомераза	30,114
P6	Amic_0038	B2UL96	Глутаминаза	33,127
P7	Amic_1829	B2UN36	Альдолаза / белок семейства аддуцинов, класс II	29,808
P8	Amic_0576	B2UPD6	Белок домена пептидазы M16	160,48
P9	Amic_1631	B2UM07	C-терминальная протеаза	83,86

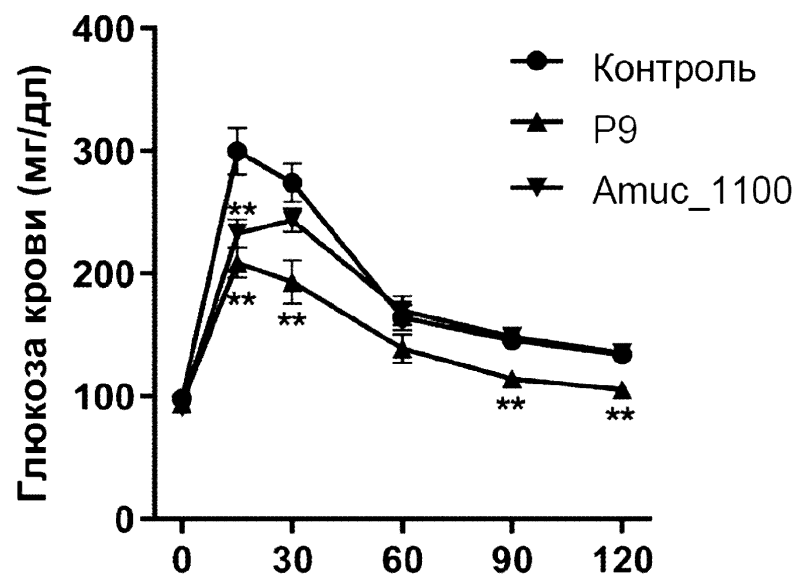
ФИГ. 10б



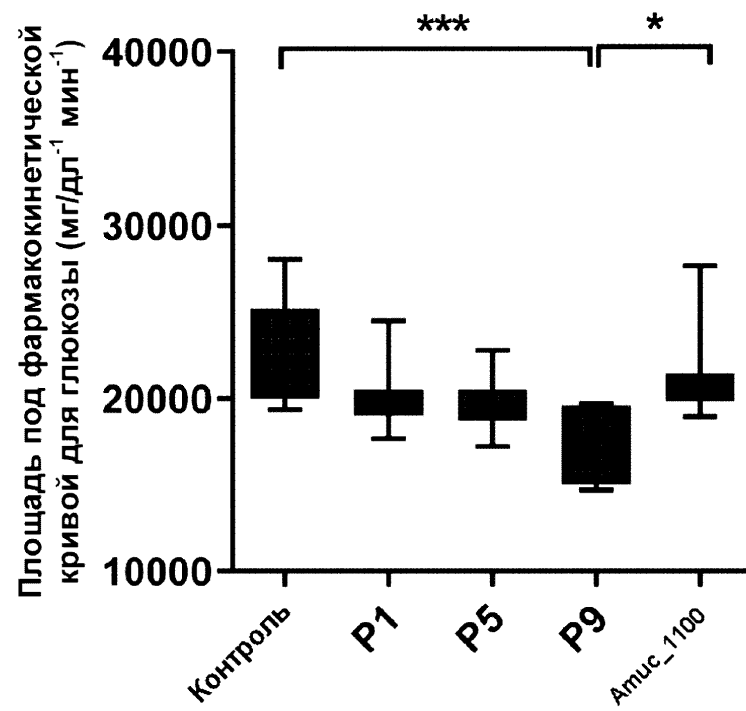
ФИГ. 10с



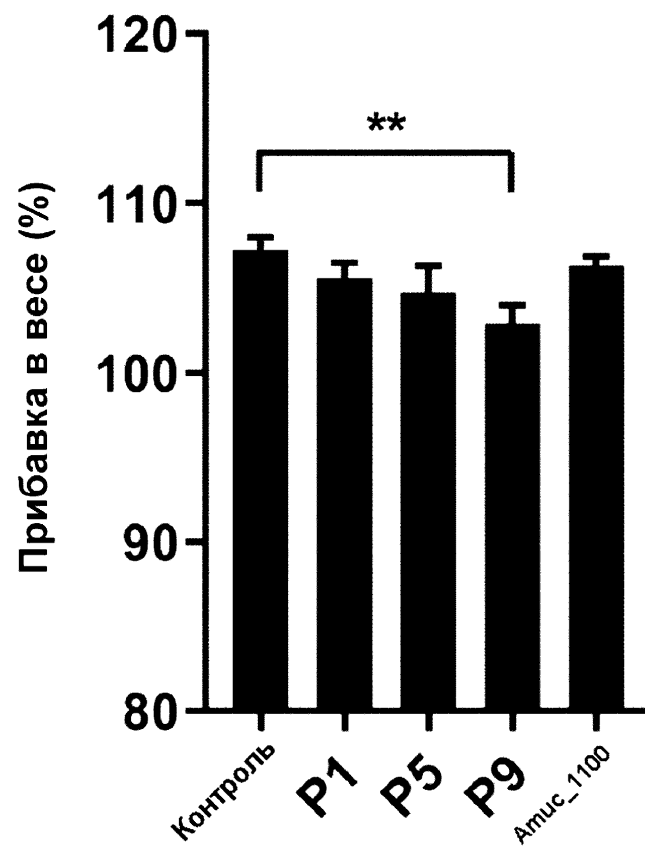
ФИГ. 11a



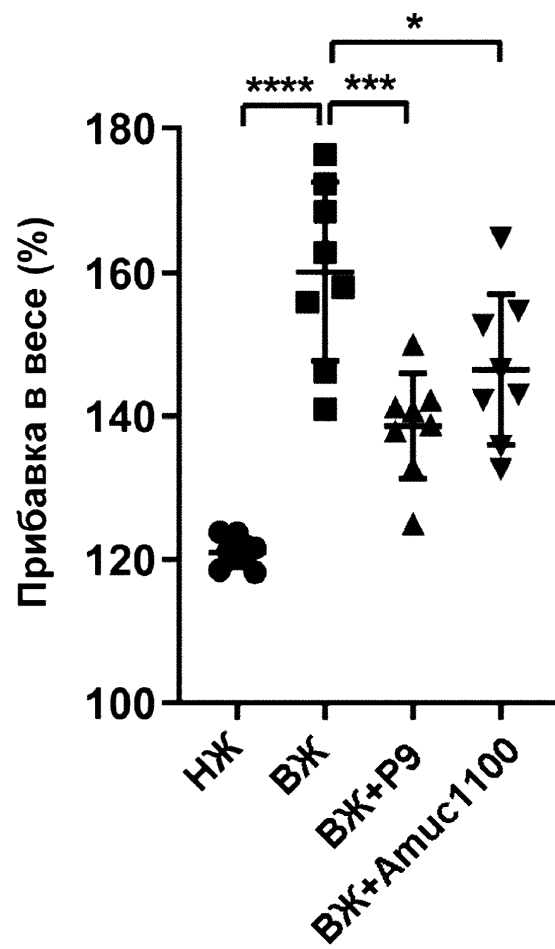
ФИГ. 11b



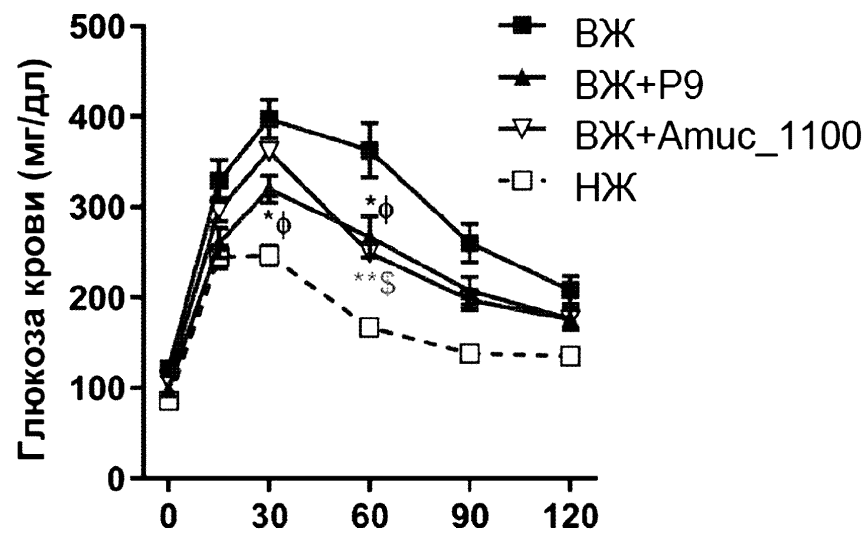
ФИГ. 11с



ФИГ. 12а



ФИГ. 12b



ФИГ. 12с

