

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 871 817**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2013 PCT/EP2013/073972**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14076246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2013 E 13792006 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 2919796**

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

30 Prioridad:

19.11.2012 WO PCT/EP2012/073011

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2021

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;
BELZER, CLARA y
DE VOS, WILLEM**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 871 817 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 para el tratamiento de trastornos metabólicos

5 Campo de invención

La presente divulgación 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. 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 250 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). Por tanto, para tratar la obesidad, se necesita el impacto en al menos uno, preferiblemente 2 y más preferiblemente 3 de estos 3 factores.

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, Rajilic-Stojanovic y de Vos, Gut 2008, 57: 1605-1615). 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).

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.

Además, el solicitante describió que la microbiota intestinal se modifica en ratones obesos tratados con prebióticos (Everard et al., Diabetes, noviembre de 2011; 60 (11): 2775-86). Además, los prebióticos (1) mejoran el metabolismo de la glucosa y los lípidos en ratones obesos, (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 (4) mejoran la sensibilidad a la leptina y la homeostasia de la glucosa en ratones obesos y diabéticos inducidos por la dieta.

Entre las modificaciones inducidas por el tratamiento prebiótico de ratones obesos se encuentra una alteración considerable de la composición de la microbiota intestinal, caracterizada por (i) una disminución de la abundancia de Bacteroidetes, Lactobacillus spp. y bacterias del grupo Bacteroides-Prevotella; y (ii) una mayor abundancia de Bifidobacterium spp., de bacterias del grupo E. rectale/C. coccoides y de Akkermansia muciniphila, perteneciente a la Verrucomicrobia. A. muciniphila, una bacteria identificada por primera vez en 2004 por el solicitante, representa aproximadamente del 1 al 3 % de la microbiota total de adultos sanos (Derrien et al, International Journal of Systematic

and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 1469-1476; Derrien et al. Applied Environmental Microbiology 2008, 74, 1646-1648.). El solicitante ha determinado el genoma completo de *Akkermansia muciniphila* (van Passel et al, PLoS One 6, 2011: e16876).

Las evidencias indirectas sugirieron una relación entre la abundancia de *A. muciniphila* y disfunciones intestinales o trastornos relacionados con la obesidad. Por ejemplo, el documento WO 2011/107481 describe que la ausencia de *Akkermansia muciniphila* en el intestino de un sujeto, combinada con la presencia de *Bacteroides capillosus* y *Clostridium leptum*, indica que este sujeto padece colitis ulcerosa. Le Roy et al. (Journal of Hepatology, vol. 56, No Suppl. 2, abril de 2012, página S23) han informado, en el contexto de experimentos de trasplante de heces, una menor proporción de *Akkermansia muciniphila* en heces de ratones que desarrollan hiperglucemia en ayunas y resistencia a la insulina cuando se alimentan con una dieta alta en grasas. Se ha demostrado que la administración de *A. muciniphila* modula la respuesta inmunitaria de la mucosa en ratones libres de gérmenes (Derrien et al. Front Microbiol 2, 166 (2011)). Además, Hansen y sus colegas demostraron que la administración de un antibiótico, vancomicina, a ratones NOD neonatales (el modelo de ratón NOD es un modelo para la diabetes) suprime la aparición clínica de la diabetes y propaga *Akkermansia muciniphila* (Hansen et al., Diabetologia, 2012 Aug; 55 (8): 2285-94). Sin embargo, esto puede ser un efecto indirecto debido a la insensibilidad de *Akkermansia* spp. intestinal al antibiótico utilizado.

Por tanto, estos resultados mostraron que la composición completa del microbiota intestinal se modifica tras la administración de prebióticos en ratones. Más específicamente, ninguna evidencia sugirió un papel específico de una especie bacteriana, como, por ejemplo, *Akkermansia muciniphila*, en la respuesta beneficiosa a la administración de prebióticos. Además, según el conocimiento del solicitante, nunca se ha descrito ni sugerido ningún efecto beneficioso de la administración directa de *Akkermansia muciniphila*.

Aquí, el solicitante demostró sorprendentemente que la administración repetida de *Akkermansia muciniphila* sola afecta las tres disfunciones subyacentes asociadas con la obesidad y trastornos relacionados, es decir, disfunciones metabólicas, estado inflamatorio de bajo grado asociado a niveles más altos de lipopolisacáridos en sangre (LPS) y función de barrera intestinal deteriorada. Por tanto, la presente invención se refiere al uso de *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma para tratar la obesidad y trastornos relacionados.

Resumen

Por tanto, la presente invención se refiere a *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que comprende obesidad, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, diabetes mellitus, preferiblemente diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico anormal, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios y dislipidemia aterogénica.

En una realización, las células viables de *Akkermansia muciniphila* deben administrarse al sujeto que lo necesite.

En una realización, *Akkermansia muciniphila* se administra por vía oral.

En una realización, se va a administrar al sujeto una cantidad de *Akkermansia muciniphila* que varía de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc.

En una realización, *Akkermansia muciniphila* debe administrarse al menos tres veces por semana.

En una realización, *Akkermansia muciniphila* debe coadministrarse con otra cepa probiótica y/o con uno o más prebióticos.

Otro objeto de la invención es una composición que comprende *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma como se describe aquí anteriormente en asociación con un excipiente para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que comprende obesidad, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, Diabetes Mellitus, preferiblemente diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico anormal, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios y dislipidemia aterogénica. En una realización, dicha composición es una composición nutricional. En una realización de la invención, dicha composición debe administrarse por vía oral.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma como se describió anteriormente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que comprende obesidad, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con resistencia a la insulina, diabetes mellitus, preferiblemente diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico anormal, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios y dislipidemia aterogénica.

Otro objeto de la presente invención es un medicamento que comprende *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma como se describió anteriormente, para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico seleccionado del grupo que comprende obesidad, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, Diabetes Mellitus, preferiblemente Diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico anormal, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios y dislipidemia aterogénica.

Otro objeto de la presente invención es el uso de *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma para promover la pérdida de peso en un sujeto que lo necesite.

La presente invención también se refiere al uso de una composición cosmética que comprende *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma para promover la pérdida de peso en un sujeto que lo necesite.

En una realización de los usos descritos anteriormente, *Akkermansia muciniphila* o fragmentos de la misma está en forma de aditivo alimentario, aditivo de bebida, suplemento dietético, producto nutricional, alimento médico o composición nutracéutica.

En una realización de los usos descritos anteriormente, las células viables de *Akkermansia muciniphila* deben administrarse al sujeto que lo necesite.

En una realización de los usos descritos anteriormente, *Akkermansia muciniphila* debe administrarse por vía oral.

En una realización de los usos descritos anteriormente, una cantidad de *Akkermansia muciniphila* que varía de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc debe ser administrado al sujeto.

En una realización de los usos descritos anteriormente, *Akkermansia muciniphila* debe administrarse al menos tres veces por semana.

En una realización de los usos descritos anteriormente, *Akkermansia muciniphila* debe coadministrarse con otra cepa probiótica y/o con uno o más prebióticos.

En una realización de los usos descritos anteriormente, el prebiótico es inulina y fructanos de tipo inulina, oligofructosa, xilosa, arabinosa, arabinoxilano, ribosa, galactosa, ramnosa, celobiosa, fructosa, lactosa, salicina, sacarosa, glucosa, esculina, Tween 80, trehalosa, maltosa, manosa, melibiosa, moco o mucinas, rafinosa, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, aminoácidos, alcoholes y cualquier combinación de los mismos, y preferiblemente inulina, fructanos de tipo inulina u oligofructosa.

En una realización, dichos usos son para reducir la masa grasa.

Definiciones

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 mejoría 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 estrictamente anaeróbicas identificadas por Derrien (Derrien et al., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 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, PLoS One 6, 2011:

e16876). En general, se acepta que las cepas con una similitud genómica de aproximadamente el 70 % pueden considerarse como la misma especie.

• “Probióticos” se refiere a preparaciones de células microbianas (tales como, por ejemplo, células microbianas vivas) o componentes de células microbianas 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 puede ser utilizada por bacterias de la microbiota intestinal y que está destinada a promover el crecimiento de bacterias probióticas en el intestino.

• “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.

• “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.

• “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* y similares. Los fragmentos se pueden obtener, por ejemplo, recuperando el sobrenadante de un cultivo de *Akkermansia muciniphila* o extrayendo componentes celulares o fracciones celulares, metabolitos o compuestos secretados de un cultivo de *Akkermansia muciniphila*. 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*. En una realización, un fragmento puede corresponder a uno o más de tales componentes presentes en *Akkermansia muciniphila* 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, patología cardíaca, accidente cerebrovascular, hígado graso no alcohólico, hiperglucemia, esteatosis hepática, 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

Esta invención se refiere a *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma para su uso en el tratamiento de trastornos metabólicos en un sujeto que lo necesite.

Como se usa en este documento, un trastorno metabólico es un trastorno relacionado con una homeostasis metabólica alterada, tal como, por ejemplo, una homeostasis glucídica o lipídica alterada.

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

Los 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, 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.

En otra realización, dicho trastorno metabólico es 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. Los 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.

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.

En una realización, en la presente invención se usan cepas vivas de *Akkermansia muciniphila*, preferiblemente las cepas vivas se derivan de células en fase estacionaria de crecimiento.

En una realización de la invención, *Akkermansia muciniphila* puede estar en forma de células viables. En otra realización de la invención, *Akkermansia muciniphila* puede estar en forma de células no viables.

En una realización, en la presente invención se utilizan células de *Akkermansia muciniphila* metabólicamente activas. En una realización, las cepas de *Akkermansia muciniphila* no se inactivan metabólicamente, en las que la inactivación metabólica puede resultar, por ejemplo, del tratamiento en autoclave.

En una realización, *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma se purifica sustancialmente. Como se usa en este documento, el término "sustancialmente purificado" significa que *Akkermansia muciniphila* 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* o un fragmento de la misma para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico.

En una realización de la invención, la cantidad eficaz de *Akkermansia muciniphila* corresponde a la cantidad de bacterias suficiente para restaurar una cantidad y/o proporción normal de *Akkermansia muciniphila* en el intestino del sujeto. De hecho, el solicitante demostró que el intestino de un sujeto obeso o con sobrepeso está agotado en *Akkermansia muciniphila* (véanse los ejemplos). 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* 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 de la invención, la cantidad eficaz de *Akkermansia muciniphila* varía 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".

En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de *Akkermansia muciniphila* 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.

En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^9 ufc.

En una realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila 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". En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila 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. En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de un fragmento de Akkermansia muciniphila varía de fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^9 ufc.

En una realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de Akkermansia muciniphila 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. En una realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de Akkermansia muciniphila que varía de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc/ml de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/ml de la composición e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/ml de la composición. En otra realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de Akkermansia muciniphila que varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml. En otra realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de Akkermansia muciniphila que varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/g o ufc/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^9 ufc/g o ufc/ml.

En una realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de fragmentos de Akkermansia muciniphila que van desde fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^2 a aproximadamente 1.10^{15} ufc/g o ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc./go ml de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ml de la composición e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/g o ml de la composición. En otra realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de fragmentos de Akkermansia muciniphila que varía desde fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml. En otra realización de la invención, la composición de la invención comprende una cantidad de fragmentos de Akkermansia muciniphila que varía desde fragmentos derivados de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/g o ufc/ml de la composición, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/g o ufc/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^9 ufc/g o ufc/ml.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización de la invención, la composición farmacéutica de la invención se utiliza en el tratamiento de un trastorno metabólico. En otra realización, la composición farmacéutica es para restaurar una proporción normal 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 o un fragmento del mismo. En una realización de la invención, el medicamento de la invención se utiliza en el tratamiento de un trastorno metabólico. En otra realización, el medicamento es 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 un trastorno metabólico en un sujeto que lo necesita, en el que dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma al sujeto.

5 Otro objeto de la divulgación es un método para restaurar una proporción normal 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 o un fragmento de la misma al sujeto.

10 En una realización, el método de la divulgación comprende administrar una cantidad eficaz de la composición, de la composición farmacéutica o del medicamento de la invención al sujeto.

15 En una realización de la invención, Akkermansia muciniphila 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 tres veces por semana. En otra realización, Akkermansia muciniphila 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.

20 En una realización, Akkermansia muciniphila 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.

25 En una realización, Akkermansia muciniphila 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...).

En una realización, la administración de Akkermansia muciniphila 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.

30 En una realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila administrada por día 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.

35 En otra realización de la invención, la cantidad diaria de Akkermansia muciniphila administrada por día 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.

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

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

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

55 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.

60 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.

65 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 invención también se refiere al uso cosmético de *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma para promover la pérdida de peso en un sujeto.

Por tanto, otro objeto de la invención es una composición cosmética que comprende una cantidad cosméticamente eficaz de *Akkermansia muciniphila* 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* o un fragmento de la misma a dicho sujeto.

En una realización, el método de la divulgación comprende administrar una cantidad cosméticamente eficaz de la composición o de la composición cosmética de la invención al sujeto.

En una realización de la invención, la cantidad cosméticamente eficaz de *Akkermansia muciniphila* varía 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. En otra realización de la invención, la cantidad cosméticamente eficaz de *Akkermansia muciniphila* 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. En otra realización de la invención, la cantidad cosméticamente eficaz de *Akkermansia muciniphila* varía de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^9 ufc.

En una realización de la invención, la cantidad cosméticamente eficaz de fragmentos de *Akkermansia muciniphila* 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. 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^{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. 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^{10} ufc, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^9 ufc.

En una realización de la invención, *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma, o la composición o composición cosmética 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 tres veces por semana. En otra realización, *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma, o la composición o composición cosmética se administra al menos una vez al día, y preferiblemente al menos dos veces al día.

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

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

En una realización de la invención, la cantidad diaria de *Akkermansia muciniphila* administrada por día 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, día, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1.10^9 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día. En otra realización de la invención, la cantidad diaria de *Akkermansia muciniphila* administrada por día 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. En otra realización de la invención, la cantidad diaria de *Akkermansia muciniphila*

administrada por día varía de 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc/día, preferiblemente de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^9 ufc/día, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^8 a aproximadamente 1.10^9 ufc/día.

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

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

[0084] En una realización de la invención, la composición, la composición farmacéutica, la composición cosmética 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.

Los 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, 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, Buttiiauxella, Bulleidia, Bilophila, Bacteroides, Anaerovorax, Anaerostipes, Anaerofilum, Enterobacteriaceae, Firmicutes, Atopobium, Alistipes, Acinetobacter, Slackie, Shigella, Shewanella, Serratia, Mahella, Lachnospira, Klebsiella, Idiomarina, Fusobacterium, Faecalibacterium, Eubacterium, Enterococcus, Enterobacter, Eggerthella.

Los ejemplos de cepas o especies procariotas que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Archaea, Firmicutes, Bacteroidetes (tales como, por ejemplo, Alistipes, Bacteroides ovatus, Bacteroides sphincticus, 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, Methanobrevibacterium, 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.

El solicitante aquí muestra que los efectos beneficiosos observados después de la administración de Akkermansia muciniphila son específicos de esta cepa bacteriana. De hecho, se muestra en los Ejemplos que la administración de Lactobacillus plantarum WCSF-1 no tiene los mismos efectos beneficiosos.

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, composición cosmética o medicamento es Akkermansia muciniphila.

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

En otra realización de la invención, la composición, composición farmacéutica, composición cosmética o medicamento consiste esencialmente en *Akkermansia muciniphila*, 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, composición cosmética o medicamento.

En una realización de la invención, *Akkermansia muciniphila* 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, la composición cosmética 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, xilosa, arabinosa, arabinoxilano, ribosa, galactosa, ramnosa, celobiosa, fructosa, lactosa, salicina, sacarosa, glucosa, esculina, tween 80, trehalosa, maltosa, manosa, melibiosa, moco o mucinas, rafinosa, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, aminoácidos, alcoholes 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 o un fragmento de la misma o la composición, composición farmacéutica, composición cosmética 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* o un fragmento de la misma o la composición, composición farmacéutica, composición cosmética 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 bucodispersantes/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, composición cosmética 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 salina tampón fosfato anaeróbico, bicarbonato sódico, jugo, leche, yogur, fórmula infantil, producto lácteo, agentes colorantes, tales como, para ejemplo, dióxido de titano (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 cacahuete, lecitina de soja o gelatina de pescado; agentes diluyentes como, por ejemplo, lactosa, lactosa monohidratada o almidón; agentes 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, composición cosmética 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 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 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, composición cosmética o medicamento está en forma de aditivo alimentario, aditivo de bebida, suplemento dietético, producto nutricional, alimento médico o composición nutracéutica.

5 Akkermansia muciniphila es una bacteria estrictamente anaeróbica. Por lo tanto, en la realización en la que se utilizan cepas vivas o viables, debe evitarse el contacto prolongado con oxígeno. Los ejemplos de medios para evitar el contacto prolongado con el oxígeno incluyen, pero no se limitan a, la congelación de las células bacterianas o el envasado en un recipiente sellado y similares.

10 El solicitante mostró en la presente 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 que la administración de A. muciniphila puede restaurar estos parámetros.

15 Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a Akkermansia muciniphila 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 disminuir la producción de compuestos antibacterianos. Otro objeto de la divulgación 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 o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

25 El solicitante demostró sorprendentemente que la administración de A. muciniphila controla la barrera intestinal regulando el espesor de la capa de moco y la producción de péptidos antimicrobianos de colon (tales como, por ejemplo, RegIIIgamma). Además, también demostraron que A. muciniphila regula la producción de acilglicerol que pertenece a la familia de los endocannabinoides involucrados en el control de la inflamación, la barrera intestinal y la secreción de péptidos intestinales (GLP-1 y GLP-2). GLP-1 y GLP-2 están involucrados en una gran variedad de funciones, incluida la mejora de la señalización de la insulina, la disminución de la inflamación y la promoción de la saciedad.

30 Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a Akkermansia muciniphila 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 o un fragmento del mismo a un sujeto que lo necesite. En una realización, Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma regula el grosor de la capa de moco (que puede disminuir en la obesidad u otros trastornos metabólicos). En otra realización, la administración de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma induce la producción de péptidos antimicrobianos de colon, tales como, por ejemplo, RegIIIgamma. En otra realización, la administración de Akkermansia muciniphila 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. En otra realización, la administración de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma regula el recambio de moco.

45 Otro objeto de la divulgación se refiere a Akkermansia muciniphila 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 o un fragmento de la misma a un sujeto en necesidad del mismo.

50 El solicitante también mostró que la administración de Akkermansia muciniphila controla el almacenamiento de grasa y el metabolismo del tejido adiposo. Por tanto, otro objeto de la divulgación se refiere a Akkermansia muciniphila 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 o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite. En una realización, dicho control no implica ningún cambio en la ingesta de alimentos. En una realización, la administración de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma suprime la endotoxemia metabólica. En otra realización, la administración de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma reduce la masa grasa. En otra realización, la administración de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la misma aumenta la expresión de ARNm de la diferenciación de adipocitos y la oxidación de lípidos, preferiblemente sin afectar la lipogénesis.

60 El solicitante también mostró que la administración de Akkermansia muciniphila regula el metabolismo del tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa. Por tanto, la presente divulgación se refiere a Akkermansia muciniphila 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 o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite. En una realización, la administración de Akkermansia muciniphila o un fragmento de la

misma revierte la hiperglucemia en ayunas inducida por la dieta. En otra realización, la administración de *Akkermansia muciniphila* 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. En otra realización, la administración de *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma induce una reducción del índice de resistencia a la insulina. En una realización, 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 %.

Además, el solicitante mostró que la administración de *Akkermansia muciniphila* conduce a la normalización de la subpoblación de macrófagos CD11c de tejido adiposo. La cantidad de células de esta población de macrófagos aumenta en los trastornos metabólicos como, por ejemplo, la obesidad y la diabetes tipo 2, y es un sello distintivo de la inflamación relacionada con estos trastornos metabólicos. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a *Akkermansia muciniphila* 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* o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite. En una realización, la administración de *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma disminuye la cantidad de macrófagos CD11c en el tejido adiposo.

Finalmente, el solicitante mostró que la administración de *Akkermansia muciniphila* reduce el colesterol plasmático en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Por tanto, la presente divulgación también se refiere a *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma para reducir 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* o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

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

En una realización, la administración de *Akkermansia muciniphila* 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* 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 de la divulgación no comprende o comprende además modular la ingesta de alimentos de dicho sujeto. En una realización, el método de la divulgación 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.

En una realización, la administración de *Akkermansia muciniphila* o un fragmento de la misma a un sujeto aumenta la saciedad en dicho sujeto. En consecuencia, de acuerdo con esta realización, el método de la divulgación 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 una combinación de gráficos que muestran que la abundancia de *Akkermansia muciniphila* está disminuida en ratones obesos y diabéticos, mientras que el tratamiento prebiótico la restaura a niveles basales y mejora la endotoxemia metabólica y trastornos relacionados. (a) Abundancia de *Akkermansia muciniphila* (Log_{10} de bacterias/g de contenido cecal) medida en el contenido cecal de ratones obesos con deficiencia de leptina (ob-ob) ($n = 5$) y sus compañeros de camada delgados (magros) ($n = 5$). (b) Abundancia de *Akkermansia muciniphila* (Log_{10} de bacterias/g de contenido cecal) medida en el contenido cecal de ratones obesos alimentados con una dieta normal (ob-CT) o tratados con prebióticos (ob-Pre) durante 5 semanas ($n = 10$). (c) Abundancia de *Akkermansia muciniphila* (Log_{10} de bacterias por g de contenido cecal) medida en el contenido cecal de ratones alimentados con dieta control (CT) o ratones alimentados con dieta CT tratados con prebióticos (CT-Pre) agregados en agua potable y HF ratones alimentados con dieta (HF) o ratones alimentados con dieta HF tratados con prebióticos (HF-Pre) añadidos en agua potable durante 8 semanas ($n = 10$). (d) Niveles séricos de LPS en la vena porta ($n = 7-9$). (e) ARNm de CD11c del marcador de infiltración de macrófagos de tejido adiposo ($n = 10$). (f) Correlación de Pearson entre los valores logarítmicos de los niveles de LPS en la vena porta y la abundancia de *Akkermansia muciniphila* (Log_{10} de bacterias por g de contenido cecal), el recuadro indica el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el valor P correspondiente. (g) Ganancia de masa grasa total medida por resonancia magnética nuclear en el dominio del tiempo ($n = 10$). Los datos en a-c se muestran como diagramas de caja. * $P < 0.05$, mediante la prueba t de Student de dos colas. Se han obtenido datos en c-g en el mismo grupo de ratones. Los datos en d, e y g se muestran como media \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis estadístico unidireccional ANOVA post-hoc.

La Figura 2 es una combinación de gráficos e imágenes que muestran que *Akkermansia muciniphila* cambia la composición de la microbiota intestinal, contrarresta la disfunción de la barrera intestinal inducida por la dieta, cambia el nivel intestinal de endocannabinoides y mejora los trastornos metabólicos en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones fueron tratados por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (PBS)) y alimentados con una dieta control (CT-Akk) o una dieta HF (HF-Akk) en comparación con los ratones alimentados con una dieta de control (CT) o una dieta alta en grasas (HF) y tratados mediante sonda oral diaria con un volumen equivalente de PBS anaeróbico estéril durante 4 semanas ($n = 10$). (a) Análisis de PCA basado en huellas dactilares filogenéticas MITChip de la microbiota intestinal del contenido cecal de los grupos de control (CT y HF) y grupos tratados con *Akkermansia muciniphila* (CTA y HFA). (b) Niveles de LPS sérico de la vena porta ($n = 6-10$). (c) Ganancia de masa grasa total medida por resonancia magnética nuclear en el dominio del tiempo ($n = 10$). (d) El índice de resistencia a la insulina se determinó multiplicando el área bajo la curva (de 0 min a 15 min) tanto de glucosa en sangre como de insulina plasmática obtenida después de una carga de glucosa oral (2 g de glucosa por kg de peso corporal) realizada después de 4 semanas de tratamiento ($n = 10$). (e) ARNm de CD11c del marcador de infiltración de macrófagos de tejido adiposo ($n = 10$). (f) Diferenciación de adipocitos (CCAAT/proteína de unión a potenciador- α , codificada por *Cebpa*), lipogénesis (acetil-CoA carboxilasa, codificada por *Acc1*; ácido graso sintasa, codificada por *Fasn*) y expresión de ARNm de marcadores de oxidación de lípidos (carnitina palmitoiltransferasa-1, codificada por *Cpt1*; acil-CoA-oxidasa codificada por *Acox1*; coactivador del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma, codificado por *Pgc1a*; y receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma, codificado por *Ppara*) se midieron en los depósitos de grasa visceral (grasa mesentérica) ($n = 10$). (g) Ileum 2-palmitoilglicerol (2-PG), 2-oleoilglicerol (2-OG), 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (expresado como % del control) ($n = 10$). (h) Espesor de la capa de moco medido mediante análisis histológicos después de la tinción con azul alcian. Imágenes representativas de azul alcian utilizadas para las medidas del espesor de la capa de moco, barras = 40 μ m ($n = 7-8$). (i) Expresión de ARNm de 3-gamma (*RegIII*), codificado por *Reg3g* derivado de islotes de regeneración de colon ($n = 10$). Los datos en a-i se han obtenido en el mismo grupo de ratones. Los datos en b-i se muestran como media \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis estadístico unidireccional ANOVA post-hoc.

La Figura 3 es una combinación de gráficos e imágenes que muestran que los ratones tratados con prebióticos exhibieron una relación inversa entre *Akkermansia muciniphila* y la infiltración de macrófagos del tejido adiposo o la ganancia de masa grasa. (a) Correlación de Pearson entre los niveles de ARNm de CD11c en el tejido adiposo y la abundancia de *Akkermansia muciniphila* (\log_{10} de bacterias por g de contenido cecal) medida en el contenido cecal de ratones alimentados con dieta de control (CT) o ratones alimentados con dieta CT tratados con prebióticos (CT - Pre) añadido en agua potable y ratones alimentados con dieta HF (HF) o ratones alimentados con dieta HF tratados con prebióticos (HF-Pre) añadidos en agua potable durante 8 semanas, el recuadro indica el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el correspondiente valor P . (b) Peso de los depósitos de grasa subcutánea, mesentérica y epididimaria (g por 100 g de peso corporal) ($n = 10$). (c) Correlación de Pearson entre la ganancia de masa de tejido adiposo y el contenido cecal Abundancia de *Akkermansia muciniphila* (\log_{10} de bacterias por g de contenido cecal), el recuadro indica el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el valor P correspondiente. Los datos en a-c se han obtenido en el mismo grupo de ratones y se muestran como media \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis estadístico unidireccional ANOVA post-hoc.

La Figura 4 es una combinación de gráficos que muestran que la alimentación por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* aumenta la abundancia cecal de estas bacterias. Abundancia de *Akkermansia muciniphila* expresada como (a) % del ARN 16S total o (b) Copias de ADN \log_{10} medidas en ratones tratados por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tampón fosfato anaeróbico (PBS) estéril) y alimentadas con una dieta de control (CT-Akk) o una dieta de HF (HF-Akk) en comparación con los ratones alimentados con una dieta de control (CT) o una dieta alta en grasas (HF) y tratados por sonda oral diaria con un volumen equivalente de anaerobios estériles PBS durante 4 semanas ($n = 10$).

La Figura 5 es una combinación de gráficos e imágenes que muestran que el tratamiento con *Akkermansia muciniphila* reduce la masa grasa sin afectar la ingesta de alimentos. (a) Peso de los depósitos de grasa subcutánea, mesentérica y epididimaria (g por 100 g de peso corporal) de ratones tratados por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (PBS)) y alimentados con un control dieta (CT-Akk) o con una dieta HF (HF-Akk) o ratones alimentados con una dieta control (CT) o con una dieta alta en grasas (HF) y tratados por sonda oral diaria con un volumen equivalente de PBS anaeróbico estéril durante 4 -semanas ($n = 10$). (b) Ingesta acumulada de alimentos (g) durante las 4 semanas de tratamiento. (c) Peso corporal final ($n = 10$). (d) Masa magra y grasa final expresada en porcentaje del peso corporal final y medida usando RMN de dominio del tiempo de 7.5 MHz (LF50 minispec; Bruker, $n = 10$). Los datos se muestran como media \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$), de acuerdo con el análisis estadístico unidireccional ANOVA post-hoc.

La Figura 6 es una combinación de gráficos que muestran que el tratamiento con *Akkermansia muciniphila* normaliza la glucemia en ayunas y reduce la expresión de ARNm de *G6pc* hepático en ayunas. (a) Glucemia en ayunas medida en ratones tratados por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (PBS)) y alimentados con una dieta de control (CT-Akk) o con una dieta HF (HF -Akk) o ratones alimentados con una dieta de control (CT) o con una dieta alta en grasas (HF)

y tratados por sonda oral diaria con un volumen equivalente de PBS anaeróbico estéril durante 4 semanas (n = 10). (b) Niveles de expresión de ARNm de glucosa-6 fosfatasa (codificada por G6pc) medidos en el hígado al final del período de 4 semanas (n = 10). Los datos se muestran como media \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P < 0.05), de acuerdo con el análisis estadístico unidireccional ANOVA post-hoc.

La Figura 7 es una combinación de gráficos que muestran que el tratamiento con *Akkermansia muciniphila* tiene efectos menores sobre el contenido de péptidos antibacterianos en el íleon y los niveles de IgA en las heces. La expresión de ARNm de Péptidos antibacterianos (a) Regeneración de 3-gamma derivada de islotes (RegIIIy, codificada por Reg3g), (b) Fosfolipasa A2 grupo IIA (codificada por Pla2g2a), (c) α -defensinas (codificada por Defa) y (d) Lisozima C (codificada por Lyzl) medida en el íleon de ratones tratados por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (PBS)) y alimentados con una dieta de control (CT-Akk) o con una dieta HF (HF-Akk) o ratones alimentados con una dieta de control (CT) o con una dieta alta en grasas (HF) y tratados por sonda oral diaria con un volumen equivalente de PBS anaeróbico estéril durante 4 semanas (n = 10). (e) Niveles de IgA fecal (μ g/g de heces). Los datos se muestran como media \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P < 0.05), de acuerdo con el análisis estadístico unidireccional ANOVA post-hoc.

La Figura 8 es una combinación de histogramas, gráficos e imágenes que muestran que *A. muciniphila* inactivada por calor no contrarresta la endotoxemia metabólica, la obesidad inducida por la dieta, la intolerancia a la glucosa oral, no mejora el metabolismo del tejido adiposo y la función de barrera intestinal en ratones con obesidad inducida por la dieta. Los ratones de control se alimentaron con una dieta de control (CT) o HF (HF) y se trataron con una sonda oral diaria que contenía PBS anaeróbico estéril y glicerol durante 4 semanas al día. Los ratones tratados recibieron una sonda oral de *A. muciniphila* viva (HF-Akk) o *A. muciniphila* inactivada metabólicamente (HF-K-Akk) ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) anaeróbica estéril) y se alimentaron una dieta HF (n = 8). (A) Niveles séricos de LPS en la vena porta (n = 6-7). (B) Ganancia total de masa grasa medida por resonancia magnética nuclear en el dominio del tiempo (n = 7-8). (C) Perfil de glucosa en plasma después de la exposición oral a 2 g/kg de glucosa en ratones que se mueven libremente, y el histograma en (D) muestra el área media bajo la curva (AUC) medida entre 0 y 120 min después de la carga de glucosa (n = 7-8). (E) Se midió la expresión de ARNm de marcadores de diferenciación de adipocitos (Cebpa), lipogénesis (Acc1; Fasn) y oxidación de lípidos (Cpt1; Acox1; Pgc1a; y Ppara) en depósitos de grasa visceral (grasa mesentérica) (n = 8). (F) Espesor de la capa de moco medido por análisis histológicos después de la tinción con azul alcian (CT n = 4, HF n = 6, HF-Akk y HF-K-Akk n = 5). (G) Imágenes representativas en azul alciano que se utilizan para medir el espesor de la capa de moco, barras = 40 μ m. M = mucosa, IM = capa mucosa interna. Los datos se muestran como medias \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P < 0.05) según el análisis estadístico de una vía ANOVA post-hoc.

La Figura 9 es una combinación de histogramas que muestra que *A. muciniphila* inactivada por calor no redujo la masa grasa subcutánea, mesentérica y epididimaria y no aumentó los péptidos antimicrobianos del colon en ratones con dieta HF. (A) Peso de los depósitos de grasa subcutánea, mesentérica y epididimaria (g por 100 g de peso corporal) medidos en ratones de control alimentados con una dieta de control (CT) o HF (HF) y tratados con una sonda oral diaria que contiene PBS anaeróbico estéril y glicerol durante 4 semanas diarias. Los ratones tratados recibieron una sonda oral de *A. muciniphila* viva (HF-Akk) o *A. muciniphila* muerta (HF-K-Akk) ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de PBS anaeróbico estéril) y se alimentaron con una dieta HF (n = 8). (B) expresión de ARNm de expresión de ARNm de 3-gamma (RegIIIy, codificada por Reg3g) derivada de islotes de regeneración de colon (n = 8-18), los datos representan los resultados de los dos estudios de *A. muciniphila*. Los datos se muestran como medias \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P < 0.05) de acuerdo con un análisis estadístico de una vía ANOVA post-hoc.

La Figura 10 es una combinación de histogramas que muestran la eficacia de un tratamiento con *A. muciniphila* 3 veces por semana durante 8 semanas. (A) Peso corporal (g) medido en ratones de control alimentados con un control (CT) (n = 8) o dieta HF (HF) (n = 10) y tratados 3 veces por semana por sonda oral con PBS anaeróbico estéril que contiene glicerol o *A. muciniphila* (HF-Akk) (n = 10) durante 8 semanas. ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de PBS anaeróbico estéril). (B) Masa grasa subcutánea. (C) Tejidos adiposos viscerales (mesentéricos y epididimales). Los datos se muestran como medias \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes (P < 0.05) de acuerdo con un análisis estadístico de una vía ANOVA post-hoc.

La Figura 11 es un histograma que muestra que *A. muciniphila* reduce el colesterol plasmático en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. (CT) Ratones alimentados con una dieta de control; (Akk) Ratones tratados por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (PBS)) y alimentados con una dieta de control; (HF) Ratones alimentados con una dieta rica en grasas; (HF-Akk) Ratones tratados por sonda oral diaria con *Akkermansia muciniphila* (10^9 células bacterianas suspendidas en 200 μ l de solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (PBS)) y alimentados con una dieta HF.

La Figura 12 es una combinación de histogramas que muestra que *L. plantarum* WCFS1 no redujo la masa grasa y no mejoró el metabolismo del tejido adiposo ni la función de barrera intestinal en ratones obesos inducidos por la dieta.

Los ratones de control se alimentaron con una dieta de control (CT) o HF (HF) y se trataron con una sonda oral diaria que contenía PBS anaeróbico estéril y glicerol durante 4 semanas. Los ratones tratados recibieron una sonda oral de *L. plantarum* WCFS1 (HF-LP) ($2 \cdot 10^8$ células bacterianas suspendidas en 200 μ l de PBS anaeróbico estéril) y se alimentaron con una dieta HF (n = 7-8). (A) Masa de grasa final medida por RMN en el dominio del tiempo (n = 7-8). (B) Se midió la expresión de ARNm de marcadores de diferenciación de adipocitos (*Cebpa*), lipogénesis (*Acc1*; *Fasn*) y oxidación de lípidos (*Cpt1*; *Acox1*; *Pgc1a*; y *Ppara*) en depósitos de grasa visceral (grasa mesentérica) (n = 7-8). (C) Espesor de la capa de moco medido por análisis histológicos después de la tinción con azul alcian (n = 4-6). (D) Niveles de LPS sérico de la vena porta (n = 6-7). (E) expresión de ARNm de colon expresión de ARNm de *RegIII* (codificado por *Reg3g*) (n = 8-18). Los datos se muestran como medias \pm e.e.m. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según el análisis estadístico de una vía ANOVA post hoc.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Materiales y métodos

Ratones

Experimento ob/ob: estudio ob/ob versus estudio magro: Se alojaron ratones ob/ob (n = 5/grupo) de seis semanas de edad (antecedentes C57BL/6, Jackson-Laboratory, Bar Harbor, ME, EE. UU.) en un ambiente controlado (ciclo de luz diurna de 12 h, apagado de luces a las 18 h) en grupos de dos o tres ratones/jaula, con libre acceso a comida y agua. Los ratones se alimentaron con una dieta de control (A04, Villemoisson-sur-Orge, Francia) durante 16 semanas. El contenido cecal se recogió sumergido en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C, para análisis adicionales de *Akkermansia muciniphila*.

Estudio prebiótico ob/ob: Se alojaron ratones ob/ob (n = 10/grupo) de seis semanas de edad (origen C57BL/6, Jackson-Laboratory, Bar Harbor, ME, EE. UU.) en un entorno controlado (12-h ciclo de luz diurna, apagado a las 18:00h) en grupos de dos ratones/jaula, con libre acceso a comida y agua. Los ratones fueron alimentados con una dieta de control (Ob-CT) (A04, Villemoisson-sur-Orge, Francia) o una dieta de control suplementada con prebióticos, como oligofructosa (Ob-Pre) (Orafti, Tienen, Bélgica) durante 5 semanas, como se describió anteriormente (Everard et al. *Diabetes* 60, 2775-2786 (2011)). Este grupo de ratones se ha caracterizado previamente en Everard et al. (*Diabetes* 60, 2775-2786 (2011)).

Experimento prebiótico rico en grasas: un grupo de ratones C57BL/6J de 10 semanas de edad (40 ratones, n = 10/grupo) (Charles River, Bruselas, Bélgica) se alojaron en grupos de cinco ratones/jaula, con acceso libre a alimentos y agua. Los ratones se alimentaron con una dieta de control (CT) (A04, Villemoisson-sur-Orge, Francia) o una dieta de control y se trataron con prebióticos, como oligofructosa (Orafti, Tienen, Bélgica) (0.3 g/ratón/día) añadidos en agua potable (CT-Pre), o con una dieta alta en grasas (HF) (60 % de grasa y 20 % de carbohidratos (kcal/100 g), D12492, dieta de investigación, New Brunswick, NJ, EE. UU.) o con una dieta con HF y tratamiento con oligofructosa (0.3 g/ratón/día) añadido en agua potable (HF-Pre). El tratamiento continuó durante 8 semanas.

Tratamiento con HFD *Akkermansia muciniphila*: un grupo de ratones C57BL/6J de 10 semanas de edad (40 ratones, n = 10/grupo) (Charles River, Bruselas, Bélgica) se alojaron en grupos de 2 ratones/jaula, con acceso a alimentos y agua. Los ratones fueron alimentados con una dieta de control (CT) (AIN93Mi; Dieta de investigación, New Brunswick, NJ, EE. UU.) o una dieta alta en grasas (HF) (60 % de grasa y 20 % de carbohidratos (kcal/100 g), D12492, Dieta de investigación, Nuevo Brunswick, Nueva Jersey, EE. UU.). Los ratones se trataron con una administración oral de *Akkermansia muciniphila* por sonda oral a la dosis de $2 \cdot 10^8$ ufc/0.2 ml suspendidos en solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (CT-Akk y HF-Akk) y los grupos de control se trataron con una sonda oral de un volumen equivalente de solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril (CT y HF). El tratamiento continuó durante 4 semanas.

Se cultivó *A. muciniphila* *Muc*^T (ATTC BAA-835) anaeróbicamente en un medio basal basado en mucina como se describió anteriormente (Derrien et al *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1469-1476 (2004)) y luego se lavó y suspendió en solución salina tampón fosfato anaeróbico, que incluye glicerol al 25 % (v/v), hasta una concentración final de $1 \cdot 10^{10}$ ufc/ml.

Tratamiento vivo con HFD *Akkermansia muciniphila* frente a muerte por calor y *Lactobacillus plantarum* WCFS1: se alojó un grupo de ratones C57BL/6J de 10 semanas de edad (40 ratones, n = 8/grupo) (Charles River, Bruselas, Bélgica) en grupos de 2 ratones/jaula, con libre acceso a comida y agua. Los ratones fueron alimentados con una dieta de control (CT) (AIN93Mi; Dieta de investigación, New Brunswick, NJ, EE. UU.) o una dieta alta en grasas (HF) (60 % de grasa y 20 % de carbohidratos (kcal/100 g), D12492, dieta de investigación, Nuevo Brunswick, Nueva Jersey, EE. UU.). Los ratones se trataron diariamente con una administración oral de *Akkermansia muciniphila* por sonda oral a la dosis de $2 \cdot 10^8$ ufc/0.2 ml suspendidos en solución salina tampón fosfato anaeróbico estéril, *A. muciniphila* se destruyó con calor/se inactivó mediante autoclave (15 min, 121°C, 225 kPa). Un control de viabilidad mediante cultivo en medio que contiene mucina confirmó la ausencia de células viables. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 se cultivó

anaeróbicamente en medio MRS (caldo Difco Lactobacilli MRS; BD), se lavó, se concentró y se manipuló de manera idéntica a la preparación de *A. muciniphila*. Los dos grupos de control (CT y HF) se trataron diariamente con una sonda oral de un volumen equivalente de PBS anaeróbico estéril que contenía una concentración final similar de glicerol (2.5 %) (reducido con una gota de citrato de titanio 100 mM) como grupos de tratamiento durante 4 semanas.

Se registró la ingesta de alimentos y agua una vez a la semana. 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).

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 6 de abril de 2010, relativa a la protección de los animales de laboratorio (número de acuerdo LA1230314).

Muestreo de tejido

Los animales se anestesiaron con isoflurano (Forene®, Abbott, Queenborough, Kent, Inglaterra) antes de la exanguinación y la toma de muestras de tejido, luego se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Los depósitos adiposos (epididimario, subcutáneo y mesentérico), en el hígado fueron disecados y pesados con precisión; la suma de los tres tejidos adiposos corresponde al índice de adiposidad. Los segmentos intestinales (íleon, ciego y colon), el contenido cecal y los tejidos adiposos se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

Espesor de la capa de moco

Los segmentos de colon proximales se retiraron inmediatamente y se fijaron en solución de Carnoy (etanol-ácido acético-cloroformo, 6/3/1 v/v/v) durante dos horas a 4 °C. Luego, las muestras se sumergieron en etanol al 100 % durante 24 horas antes de procesarlas para su inclusión en parafina. Se tiñeron secciones de parafina de 5 µm con azul alcian. Un investigador ciego a los grupos experimentales realizó un mínimo de 20 mediciones diferentes perpendiculares a la capa interna de moco por campo. Se analizaron de 5 a 19 campos seleccionados al azar para cada colon para un total de 2146 mediciones usando un analizador de imágenes (Motic-image Plus 2.0ML, Motic, China).

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 µl de cada muestra en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent).

Se preparó ADNc mediante transcripción inversa de 1 µg 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 StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Den Ijssel, Países Bajos) 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 $2^{-\Delta\Delta CT}$. 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.

Cebadores		Secuencia
RPL-19	Directo	GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA (SEQ ID NO: 1)
	Inverso	CCTGTTGCTCACTTGT (SEQ ID NO: 2)
Reg3g	Directo	TTCCTGTCCTCCATGATCAAA (SEQ ID NO: 3)
	Inverso	CATCCACCTCTGTTGGGTTC (SEQ ID NO: 4)
Lyzl	Directo	GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG (SEQ ID NO: 5)
	Inverso	CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG (SEQ ID NO: 6)
Pla2g2a	Directo	AGGATTCCCCAAGGATGCCAC (SEQ ID NO: 7)
	Inverso	CAGCCGTTTCTGACAGGAGTTCTGG (SEQ ID NO: 8)

(continuación)

Cebadores		Secuencia
CD11cc	Directo	ACGTCAGTACAAGGAGATGTTGGA (SEQ ID NO: 9)
	Inverso	ATCCTATTGCAGAATGCTTCTTTACC (SEQ ID NO: 10)
Defa	Directo	GGTGATCATCAGACCCCAGCATCAGT (SEQ ID NO: 11)
	Inverso	AAGAGACTAAAAGTGGAGAGCAGC (SEQ ID NO: 12)
Fasn	Directo	TTCCAAGACGAAAATGATGC (SEQ ID NO: 13)
	Inverso	AATTGTGGGATCAGGAGAGC (SEQ ID NO: 14)
Cpt1a	Directo	AGACCGTGAGGAAGTCAAACCTAT (SEQ ID NO: 15)
	Inverso	TGAAGAGTCGCTCCCACT (SEQ ID NO: 16)
Pgc1a	Directo	AGCCGTGACCACTGACAACGAG (SEQ ID NO: 17)
	Inverso	GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG (SEQ ID NO: 18)
Ppara	Directo	CAACGGCGTCGAAGACAAA (SEQ ID NO: 19)
	Inverso	TGACGGTCTCCACGGACAT (SEQ ID NO: 20)
Acox1	Directo	CTATGGGATCAGCCAGAAAGG (SEQ ID NO: 21)
	Inverso	AGTCAAAGGCATCCACCAAAG (SEQ ID NO: 22)
Acc1	Directo	TGTTGAGACGCTGGTTTGTAGAA (SEQ ID NO: 23)
	Inverso	GGTCCTTATTATTGTCCCAGACGTA (SEQ ID NO: 24)
Cebpa	Directo	GAGCCGAGATAAAGCCAAACA (SEQ ID NO: 25)
	Inverso	GCGCAGGCGGTCATTG (SEQ ID NO: 26)
G6pc	Directo	AGGAAGGATGGAGGAAGGAA (SEQ ID NO: 27)
	Inverso	TGGAACCAGATGGGAAAGAG (SEQ ID NO: 28)

Índice de resistencia a la insulina

- 5 El índice de resistencia a la insulina se determinó multiplicando el área bajo la curva (0 min y 15 min) tanto de glucosa en sangre como de insulina plasmática obtenida después de una carga de glucosa oral (2 g de glucosa por kg de peso corporal) realizada después de 4 semanas (estudio de A. muciniphila) de tratamiento. La comida se retiró dos horas después del inicio del ciclo de luz diurna y los ratones se trataron después de un período de ayuno de 6 h como se describió anteriormente (Everard et al. Diabetes 60, 2775-2786 (2011)).

- 10 **Análisis bioquímicos**
- 15 La concentración de LPS en sangre de la vena porta se midió usando Endosafe-MCS (Charles River Laboratories, Lyon, Francia) 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 suero se diluyó 1/10 con tampón libre de endotoxina para minimizar las interferencias en la reacción (inhibición o mejora) y se calentó durante 15 min a 70 °C. Cada muestra se diluyó 1/70 o 1/100 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 inferior de detección fue 0.005 UE/ml. La concentración de insulina en plasma se determinó en 25 µl de plasma usando un kit ELISA (Mercodia, Upssala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 20

Los niveles de IgA fecal se determinaron usando un kit ELISA (E99-103, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Las heces recién recolectadas se congelaron a -80 °C y luego se diluyeron en Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 0.14 M, albúmina

de suero bovino al 1 %, Tween 20 al 0.05 %. Se utilizó una dilución 1/250 para medir la IgA mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de ADN de muestras cecales de ratón

El contenido cecal de los ratones recogidos post mortem se almacenó a -80 °C. El ADN metagenómico se extrajo del contenido cecal usando un mini-kit de heces QIAamp-DNA (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de los niveles intestinales de endocannabinoides.

Se homogeneizaron tejidos de íleon en CHCl₃ (10 ml) y se añadieron patrones deuterados. La extracción y las curvas de calibración se generaron como se describió anteriormente (Muccioli et al, Mol Syst Biol, 2010, 6, 392), y los datos se normalizaron por el peso de la muestra de tejido.

qPCR: cebadores y condiciones

Los cebadores y sondas utilizados para detectar *Akkermansia muciniphila* se basaron en secuencias del gen de ARNr 16S: F-*Akkermansia muciniphila* CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT (SEQ ID NO: 29), R-*Akkermansia muciniphila* CAGCACGTGAAGGTGGGGAC (SEQ ID NO: 29), R-*Akkermansia muciniphila* CAGCACGTGAAGGTGGGGAC (SEQ ID NO: 30). La detección se logró con el software y el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Den Ijssel, Países Bajos) utilizando Mesa Fast qPCR™ (Eurogentec, Seraing, Bélgica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada ensayo se realizó por duplicado en la misma serie. El umbral de ciclo de cada muestra se comparó luego con una curva estándar (realizada por triplicado) preparada diluyendo ADN genómico (dilución en serie de cinco veces) (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Los datos se expresan como logaritmo de bacterias/g de contenido cecal.

MITChip: cebadores y condiciones de PCR

El ADN extraído del contenido cecal se analizó usando el chip del tracto intestinal de ratón (MITChip), un microarreglo filogenético que consta de 3580 sondas de oligonucleótidos diferentes que se dirigen a dos regiones hipervariables del gen de ARNr 16S (regiones V1 y V6). El análisis del MITChip se realizó como se describió anteriormente (Everard et al. Diabetes 60, 2775-2786 (2011); Geurts et al. Front Microbiol. 2, 149 (2011)). Brevemente, el análisis de microbiota se llevó a cabo en el nivel 2 correspondiente al nivel de género. El análisis multivariado se realizó mediante análisis de diferencias representativas (RDA) como se implementó en el paquete de software CANOCO 4.5 (Biometris, Wageningen, Países Bajos) en intensidades de señal promedio para 99 grupos bacterianos (niveles 2). Todas las variables ambientales se transformaron como log (1 + X). Se utilizó una prueba de permutación de Monte-Carlo basada en 999 permutaciones aleatorias para probar la significancia. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Medición del colesterol plasmático

Se analizaron muestras de plasma para determinar el colesterol midiendo el colesterol presente después de la hidrólisis enzimática del colesterol éster, usando un kit comercial (DiaSys, Condom, Francia).

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 Newman-Keuls. Las correlaciones se analizaron mediante la correlación de Pearson. Los datos con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes $P < 0.05$, 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 $P < 0.05$.

Resultados

Encontramos que la abundancia de *A. muciniphila* era 3300 veces menor en ratones obesos deficientes en leptina frente a sus compañeros de camada delgados (Fig. 1a). Consistentemente, encontramos una disminución de 100 veces en ratones alimentados con alto contenido de grasa (HF) (Fig. 1c). En ambos modelos, los prebióticos restauran completamente el recuento de *A. muciniphila* (Fig. 1b, c). En ratones alimentados con HF, los prebióticos abolieron la endotoxemia metabólica (Fig. 1d), Normalizaron la subpoblación de macrófagos CD11c de tejido adiposo (Fig. 1e) y redujeron la masa grasa (Fig. 1g y Fig. 3b). Estos resultados se correlacionaron significativamente e inversamente con *A. muciniphila* (Fig. 1f y Fig. 3a, c). Sin embargo, queda por demostrar si los mecanismos moleculares que subyacen a la aparición de estos trastornos se basan en la falta de *A. muciniphila* y, por el contrario, si la mejora después del tratamiento prebiótico es el resultado de su mayor abundancia.

Para abordar esta cuestión, se administró por vía oral *A. muciniphila* a ratones de control o alimentados con HF durante cuatro semanas, aumentando así *A. muciniphila* (Fig. 4a, b). Utilizando una micromatriz filogenética (MITChip) (Everard et al. Diabetes 60, 2775-2786 (2011); Geurts et al. Front Microbiol. 2, 149 (2011)), encontramos que tanto la dieta HF como la colonización de *A. muciniphila* afectó significativamente la compleja relación entre las bacterias dentro de la composición de la microbiota intestinal, como lo muestran los análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 2a) y el apoyo de los cambios relativos de diferentes taxones.

Encontramos que el tratamiento con *A. muciniphila* normalizó la endotoxemia metabólica inducida por la dieta, la adiposidad y el marcador CD11c del tejido adiposo (Fig. 2b, c, e y Fig. 5a), sin ningún cambio en la ingesta de alimentos (Fig. 5b). Además, el tratamiento con *A. muciniphila* redujo el peso corporal y mejoró la composición corporal (es decir, relación masa grasa/masa magra) (Fig. 5c y 5d). En consecuencia, planteamos la hipótesis de que *A. muciniphila* tendría un impacto en el metabolismo del tejido adiposo, y descubrimos que bajo la dieta HF, *A. muciniphila* aumentaba la expresión de ARNm de marcadores de diferenciación de adipocitos y oxidación de lípidos sin afectar la lipogénesis (Fig. 2f). Juntos, estos datos sugieren además que *A. muciniphila* controla el almacenamiento de grasa y el metabolismo del tejido adiposo.

A continuación, descubrimos que la colonización con *A. muciniphila* invirtió completamente la hiperglucemia en ayunas inducida por la dieta, mediante un mecanismo asociado con una reducción del 40 % de la expresión de glucosa-6-fosfatasa hepática (Fig. 6a, b), lo que sugiere una reducción de la gluconeogénesis. En particular, el índice de resistencia a la insulina se redujo de manera similar después del tratamiento (Fig. 2d). En conjunto, estos resultados sugieren que *A. muciniphila* contribuye a la regulación del metabolismo del tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa. Una explicación sería que *A. muciniphila* juega un papel clave en diferentes niveles de regulación de la función de barrera intestinal. Los datos recientes sugieren que las células intestinales también contribuyen al mantenimiento de la barrera intestinal al secretar péptidos antimicrobianos, dando forma a las comunidades microbianas (Pott et al, EMBO Rep (2012)).

Para aclarar aún más cómo la colonización de *A. muciniphila* afecta la función de barrera intestinal; medimos la expresión de marcadores antibacterianos de Paneth y células epiteliales en el íleon. Encontramos que *A. muciniphila* aumentó la expresión de Reg3g (regeneración de 3-gamma derivada de islotes, RegIIIy) bajo dieta de control, mientras que este efecto no se observó en ratones alimentados con HF (Fig. 7a). La expresión de Pla2g2a, Defa fue similar entre los grupos, mientras que la expresión de Lyz1 tiende a ser menor después de la administración de bacterias (Fig. 7b, c, d). Las IgA se secretan en el lumen intestinal y se sabe que restringen la penetración de bacterias en la mucosa (Vaishnava, S., et al. Science 334, 255-258 (2011)), aquí encontramos que los niveles de IgA fecal no se vieron afectados por los tratamientos (Fig. 7e). Por lo tanto, lo que sugiere que *A. muciniphila* controla la función de barrera intestinal mediante otros mecanismos que involucran su señalización epitelial (Derrien et al. Front Microbiol 2, 166 (2011)). No podemos descartar que el sistema endocannabinoide cumpla una función crucial en este contexto; ya que encontramos que el tratamiento con *A. muciniphila* aumentó los niveles intestinales de 2-oleoilglicerol, 2-palmitoilglicerol y 2-araquidonoilglicerol (Fig. 2g). Es importante destacar que se ha demostrado que el 2-oleoilglicerol estimula la liberación del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) de las células L intestinales, lo que sugiere que tanto el GLP-1 como el GLP-2 podrían mejorar la barrera intestinal y la homeostasis de la glucosa en este contexto (Hansen, et al., J Clin Endocrinol Metab 96, E1409-1417 (2011)). Además, el 2-araquidonoilglicerol reduce la permeabilidad intestinal y el 2-palmitoilglicerol (Alhouayek et al FASEB J 25, 2711-2721 (2011); Ben-Shabat, et al. Eur.J.Pharmacol. 353, 23-31 (1998)) potencia efectos antiinflamatorios del 2-araquidonoilglicerol. Por lo tanto, es probable que el aumento de los niveles de estos tres endocannabinoides observados después de la colonización por *A. muciniphila* constituya un evento molecular que vincule estas características metabólicas.

Evidencias recientes apoyan que las interacciones entre la microbiota intestinal y la capa de moco son sistemas dinámicos que afectan la biología de la barrera mucosa (Belzer et al, ISME J 6, 1449-1458 (2012); Johansson et al, Proc Natl Acad Sci U S A 108 Suppl 1, 4659-4665 (2011)). Por lo tanto, investigamos el impacto de la colonización de *A. muciniphila* en el espesor de la capa interna de moco. Sorprendentemente, encontramos una capa de moco un 46 % más fina en ratones alimentados con HF (Fig. 2h), mientras que la colonización de *A. muciniphila* contrarresta esta disminución (Fig. 2h). Juntos, estos nuevos hallazgos apoyan la idea de que la presencia de *A. muciniphila* dentro de la capa de moco es un mecanismo crucial para controlar el recambio de moco (Belzer et al, ISME J 6, 1449-1458 (2012)). A continuación, examinamos si *A. muciniphila* también afecta a la expresión de Reg3g en las células epiteliales del colon. Sorprendentemente, la expresión de Reg3g se redujo en aproximadamente un 50 % con la dieta HF. *A. muciniphila* mitigó completamente este efecto e incluso aumentó más la expresión de Reg3g en un 400 % en comparación con los ratones alimentados con HF (Fig. 2i). Por lo tanto, esto vincula la colonización del colon, pero no del íleon, por *A. muciniphila* con el mecanismo inmunitario fundamental por el cual RegIIIy promueve el mutualismo huésped-bacteria y regula las relaciones espaciales entre la microbiota y el huésped (Vaishnava, S., et al. Science 334 255-258 (2011)). Es importante señalar que en ratones libres de gérmenes, *A. muciniphila* induce la expresión génica en el colon en lugar de en el íleon (Derrien et al. Front Microbiol 2, 166 (2011)).

Para demostrar aún más si *A. muciniphila* tiene que estar viva para ejercer sus efectos metabólicos, hemos comparado el impacto de la administración viable de *A. muciniphila* (2.10^8 células bacterianas suspendidas en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) anaeróbica estéril) a *A. muciniphila* muerta por calor/inactivada (autoclave, 15 minutos, 121 °C, 225 kPa). Encontramos que *A. muciniphila* viable y metabólicamente activa contrarresta la

endotoxemia metabólica inducida por la dieta, el desarrollo de masa grasa y el metabolismo alterado del tejido adiposo (Fig. 8A, B, D y Fig. 9A) en un grado similar al observado en la primera serie de experimentos. Es importante destacar que estos efectos no se observaron después de la administración de *A. muciniphila* inactivada por calor (Fig. 8A, B, D y Fig. 9A). Además, encontramos que *A. muciniphila* metabólicamente activa redujo significativamente los niveles de glucosa en plasma después de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (Fig. 8C), mientras que *A. muciniphila* inactivada por calor exhibió intolerancia a la glucosa similar a la de los ratones alimentados con HF (Fig. 8C). Finalmente, confirmamos que *A. muciniphila* metabólicamente activa restauró el espesor de la capa de moco con la dieta HF mientras que encontramos que *A. muciniphila* inactivada por calor no mejoró el espesor de la capa de moco en comparación con HF (Fig. 8E y F). Vale la pena señalar que encontramos 100 veces más *A. muciniphila* metabólicamente activa recuperada del contenido cecal y colónico de ratones tratados con *A. muciniphila* en comparación con el grupo de bacterias HF e inactivadas por calor (HF-Akk: $9.5 \pm 1.02 \text{ Log}_{10}$ células/mg de contenido, HF y HF-K-Akk: $6.8 \pm 0.51 \text{ Log}_{10}$ células/mg de contenido, $P = 0.0059$), evidenciando así la viabilidad de *A. muciniphila* tras la administración oral.

Por tanto, estos resultados confirman que la obesidad inducida por la dieta HF está asociada con cambios en la composición de la microbiota intestinal, sin embargo, los péptidos antimicrobianos en el íleon no se vieron afectados por los tratamientos. Por el contrario, la expresión de Reg3g en las células epiteliales del colon se redujo significativamente en aproximadamente un 50 % en ratones tratados con HF y *A. muciniphila* inactivados por calor, mientras que el tratamiento con *A. muciniphila* metabólicamente activa mitigó completamente este efecto y aumentó la expresión de Reg3g con la dieta HF (Fig. 9B).

Entonces queríamos probar si la administración de *A. muciniphila* seguía siendo eficaz durante un tratamiento prolongado con una dieta alta en grasas (8 semanas) y si la administración de *A. muciniphila* 3 veces por semana (en lugar de diariamente) era suficiente para proteger contra obesidad inducida por la dieta. Las preparaciones, así como las dosis de *A. muciniphila* fueron similares a las presentadas en el protocolo utilizando una sonda oral diaria o *A. muciniphila* inactivada metabólicamente.

Encontramos que el tratamiento con *A. muciniphila* reduce la ganancia de peso corporal (Fig. 10A) en aproximadamente un 30 %, aunque los ratones ingirieron una dieta alta en grasas sin pérdida de grasa en las heces y cambios en el comportamiento de ingesta de alimentos. Esto también se asoció con una reducción de aproximadamente el 45 % del peso del tejido adiposo (tejido adiposo subcutáneo) (Figura 10B) y una disminución del 35 % en los depósitos de grasa visceral (mesentérico y epididimario) (Figura 10C). Por tanto, este conjunto de datos respalda el hecho de que la administración de *A. muciniphila* sigue siendo eficaz durante un tratamiento prolongado y el tratamiento sigue siendo eficaz si *A. muciniphila* se administra 3 veces por semana en lugar de diariamente.

Para confirmar que estos resultados eran específicos de *A. muciniphila*, luego tratamos ratones alimentados con HF con un probiótico (es decir, *Lactobacillus plantarum* WCFS1). Encontramos que la administración de *L. plantarum* no modificó el desarrollo de la masa grasa, el metabolismo del tejido adiposo, el grosor de la capa mucosa, el ARNm de Reg3g del colon y la endotoxemia metabólica (Fig. 12A-E).

Se sabe que la hipercolesterolemia es un factor clave implicado en las enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, probamos el efecto de la administración de *A. muciniphila* sobre el colesterol plasmático de ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Como se muestra en la Figura 11, el tratamiento con *A. muciniphila* reduce significativamente (alrededor del 15 %) el colesterol plasmático, contribuyendo así con LPS y los otros parámetros metabólicos a un perfil de riesgo cardio-metabólico mejorado.

En resumen, nuestros hallazgos no solo proporcionan información sustancial sobre los intrincados mecanismos mediante los cuales *A. muciniphila* regula la diafonía entre el huésped y la microbiota intestinal, sino que también proporcionan una justificación para considerar el desarrollo de un tratamiento que utilice este moco humano. colonizador para la prevención o el tratamiento de la obesidad y trastornos metabólicos asociados como, por ejemplo, hipercolesterolemia.

Lista de secuencias

<110> Universit  catholique de Louvain Wageningen Universiteit CANI, Patrice

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

<130> CV - 226/PCT/2

<160> 30

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador RPL-19 Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 1
 10 gaaggtcaaa gggaatgtgt tca 23

 <210> 2
 <211> 16
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..16
 20 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador RPL-19 Inverso" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 2
 cctgttgctc acttgt 16

 25 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Reg3g Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 35 <400> 3
 ttctgtcct ccatgatcaa a 21

 <210> 4
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 45 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Reg3g Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 4
 50 catccacctc tgggggttc 20

 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Lyz1 Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 60 <400> 5
 gccaaggtct acaatcggtg tgagttg 27

 <210> 6
 65 <211> 23
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Lyz1 Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 6
 10 cagtcagcca gcttgacacc acg 23
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Pla2g2a Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 20 <400> 7
 aggattcccc caaggatgcc ac 22
 <210> 8
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Pla2g2a Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 8
 35 cagccgtttc tgacaggagt tctgg 25
 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 45 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador CD11cc Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 9
 acgtcagtac aaggagatgt tgga 24
 50 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador CD11cc Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 60 <400> 10
 atcctattgc agaattgcttc ttacc 26
 <210> 11
 <211> 26
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 5 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Defa Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 11
 ggtgatcatc agaccccagc atcagt 26

 10 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Defa Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 20 <400> 12
 aagagactaa aactgaggag cagc 24

 <210> 13
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Fasn Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 13
 35 ttccaagacg aaaatgatgc 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Fasn Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 45 <400> 14
 aattgtggga tcaggagagc 20

 <210> 15
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 55 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Cpt1a Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 15
 60 agaccgtgag gaactcaaac ctat 24

 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Cpt1a Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 5
 <400> 16
 tgaagagtcg cttccact 18
 <210> 17
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Pgc1a Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 17
 20 agccgtgacc actgacaacg ag 22
 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 30 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Pgc1a Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 18
 gctgcatggt tctgagtct aag 23
 35 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Ppara Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 45 <400> 19 caacggcgtc gaagacaaa 19
 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 55 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Ppara Directo" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 20
 tgacgtgtc cacggacat 19
 60 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <221> fuente

ES 2 871 817 T3

<222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador AcoxI Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

5 <400> 21
 ctatgggatc agccagaaag g 21

10 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador AcoxI Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

20 <400> 22
 agtcaaaggc atccaccaa g 21

25 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Acc1 Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

35 <400> 23
 tgttgagacg ctggttgta gaa 23

40 <210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Acc1 Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

50 <400> 24
 gttcctatt attgtcccag acgta 25

55 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Cebpa Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

65 <400> 25
 gagccgagat aaagccaaac a 21

70 <210> 26
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

75 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..16

<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador Cebpa Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 26
gcgcaggcgg tcattg 16

5 <210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador G6pc Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 27
aggaaggatg gaggaaggaa 20

20 <210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador G6pc Directo" /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 28
tggaaccaga tgggaaagag 20

35 <210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador F-Akkermansia muciniphila" /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 29
ccttgcggtt ggcttcagat 20

50 <210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador R-Akkermansia muciniphila" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 30
cagcacgtga aggtggggac 20

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, trastornos relacionados con la deficiencia de insulina o resistencia a la insulina, diabetes mellitus, preferiblemente diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo anormal de lípidos, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios relacionados con la obesidad, síndrome metabólico y dislipidemia aterogénica.
2. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células viables de Akkermansia muciniphila deben administrarse al sujeto que lo necesite.
3. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que Akkermansia muciniphila se administra por vía oral.
4. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una cantidad de Akkermansia muciniphila varía de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, e incluso más preferiblemente, se administrarán al sujeto de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc.
5. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Akkermansia muciniphila debe administrarse al menos tres veces por semana.
6. Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que Akkermansia muciniphila se va a coadministrar con otra cepa probiótica y/o con uno o más prebióticos.
7. Una composición para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico que comprende Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en asociación con un excipiente, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad, deficiencia de insulina o insulina trastornos relacionados con la resistencia, diabetes mellitus, preferiblemente diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico anormal, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios relacionados con la obesidad, síndrome metabólico y dislipidemia aterogénica.
8. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha composición es una composición nutricional.
9. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que dicha composición debe administrarse por vía oral.
10. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico que comprende Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, diabetes mellitus, preferiblemente diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico anormal, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios relacionados con la obesidad, síndrome metabólico y dislipidemia aterogénica.
11. Un medicamento para usar en el tratamiento de un trastorno metabólico que comprende Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho trastorno metabólico se selecciona del grupo que comprende obesidad, deficiencia de insulina o trastornos relacionados con la resistencia a la insulina, Diabetes Mellitus, preferiblemente diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico anormal, hiperglucemia, dislipidemia, hipercolesterolemia, trastornos inflamatorios e inmunitarios relacionados con la obesidad, síndrome metabólico y dislipidemia aterogénica.
12. Uso no terapéutico de Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para promover la pérdida de peso en un sujeto que lo necesite.
13. Uso no terapéutico de una composición cosmética que comprende Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma para promover la pérdida de peso en un sujeto que lo necesite.
14. El uso y la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 y 12 a 13, en el que Akkermansia muciniphila o fragmentos de la misma se encuentra en forma de aditivo alimentario, aditivo de bebida, suplemento dietético, producto nutricional, alimento médico o composición nutracéutica.
15. El uso y la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que las células viables de Akkermansia muciniphila deben administrarse al sujeto que lo necesite.

16. El uso y la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en los que *Akkermansia muciniphila* se administra por vía oral.
- 5 17. El uso y la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que una cantidad de *Akkermansia muciniphila* varía de aproximadamente 1.10^4 a aproximadamente 1.10^{12} ufc, más preferiblemente de aproximadamente 1.10^5 a aproximadamente 1.10^{11} ufc, e incluso más preferiblemente se administrarán al sujeto de aproximadamente 1.10^6 a aproximadamente 1.10^{10} ufc.
- 10 18. El uso y la composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en los que *Akkermansia muciniphila* debe administrarse al menos tres veces por semana.
19. El uso y la composición para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en donde *Akkermansia muciniphila* se va a coadministrar con otra cepa probiótica y/o con h uno o más prebióticos.
- 15 20. El uso y composición de uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el prebiótico es inulina y fructanos de tipo inulina, oligofructosa, 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 y cualquier combinación de los mismos, y
- 20 preferiblemente inulina, fructanos de tipo inulina u oligofructosa.
21. Uso y composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, para reducir la masa grasa.

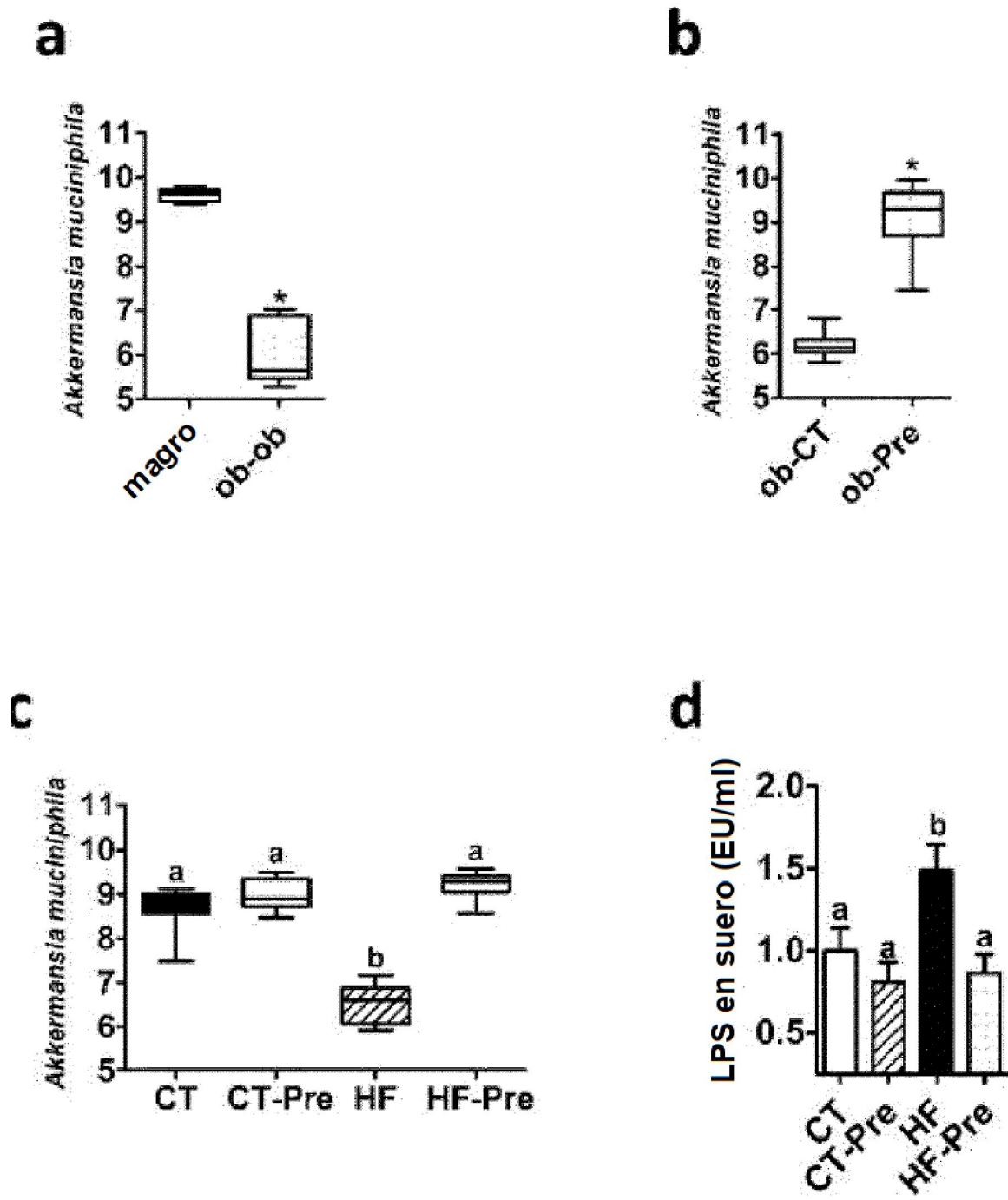
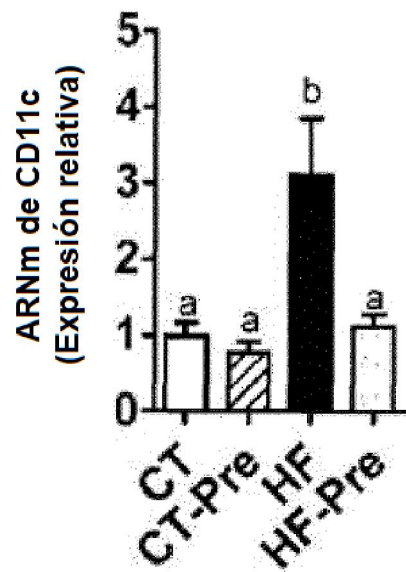
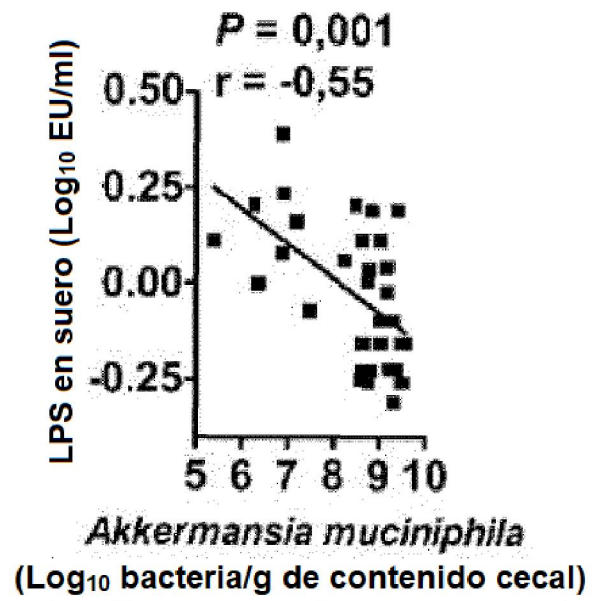


FIG. 1A-D

e



f



g

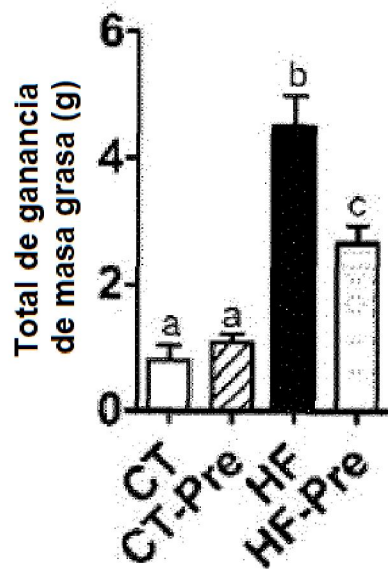


FIG. 1E-G

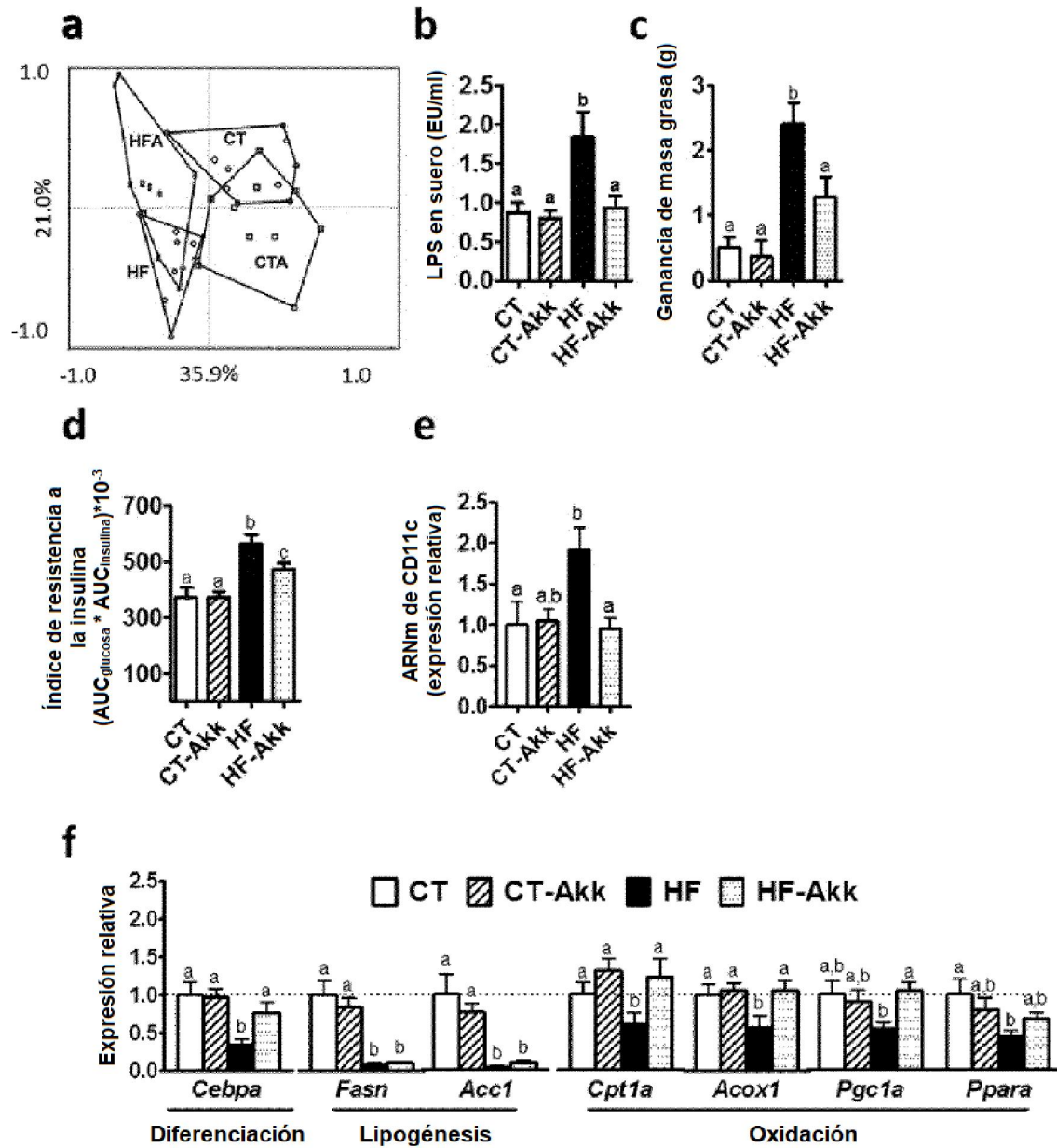


FIG. 2A-F

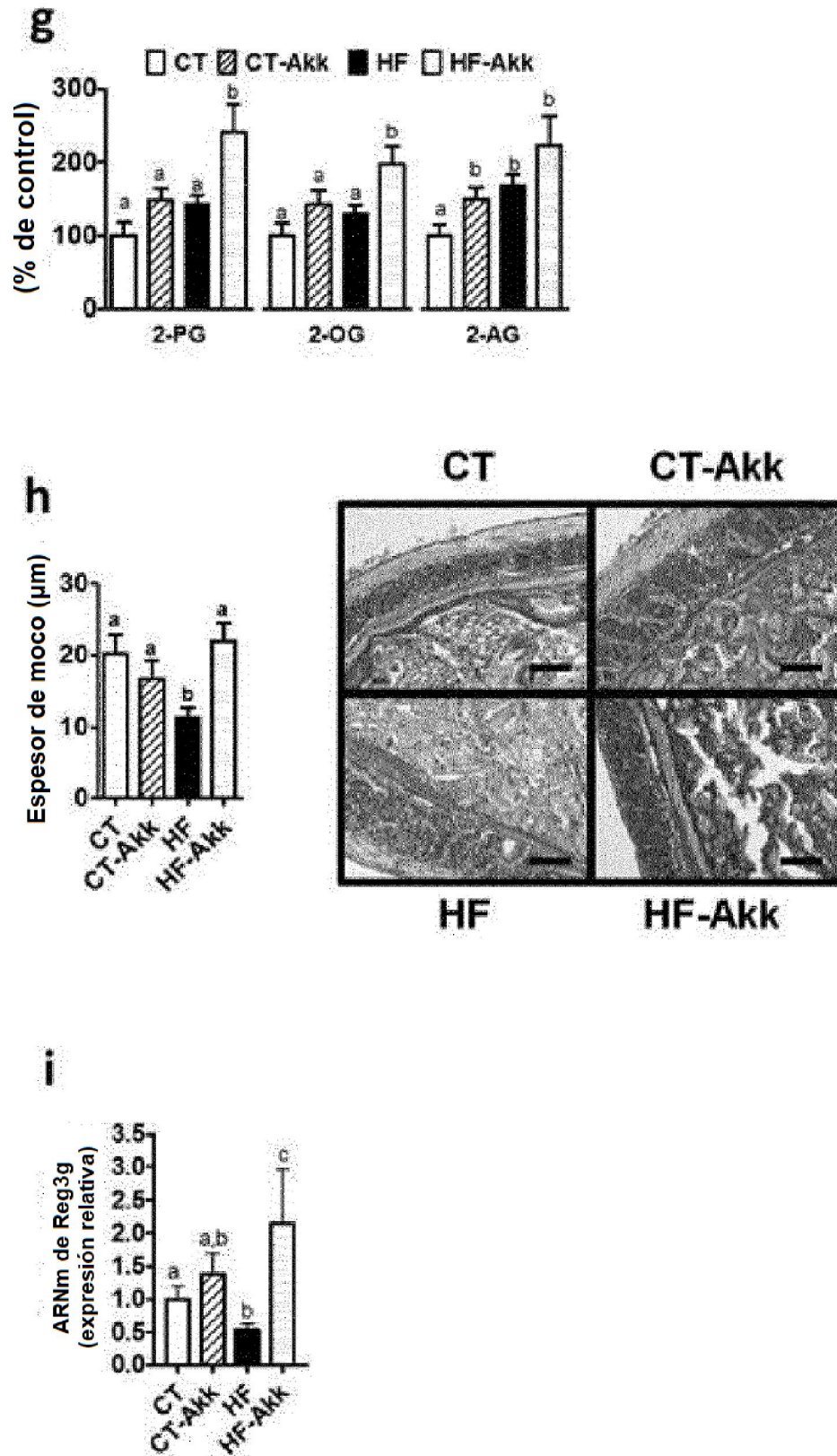


FIG. 2G-I

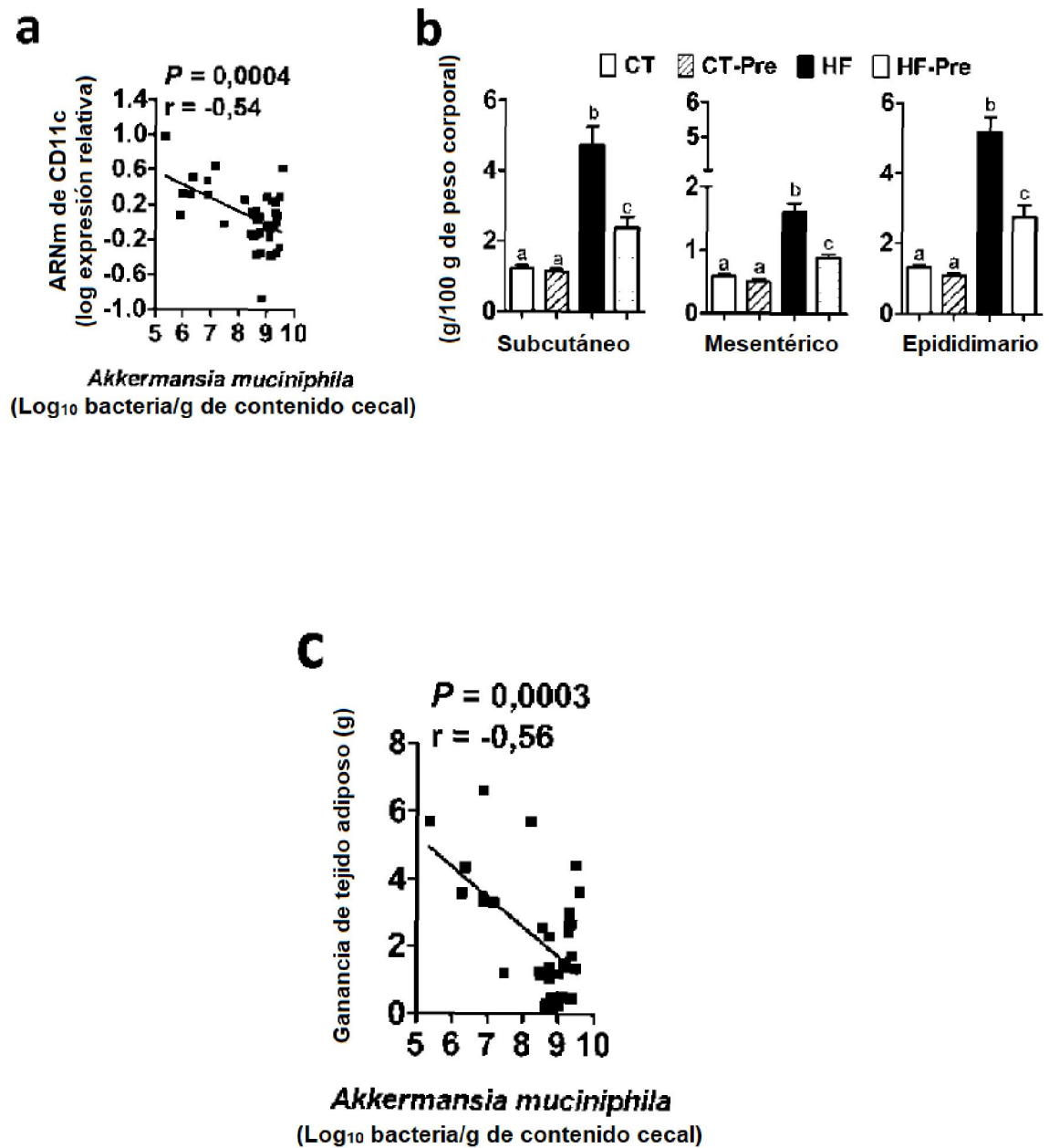


FIG. 3

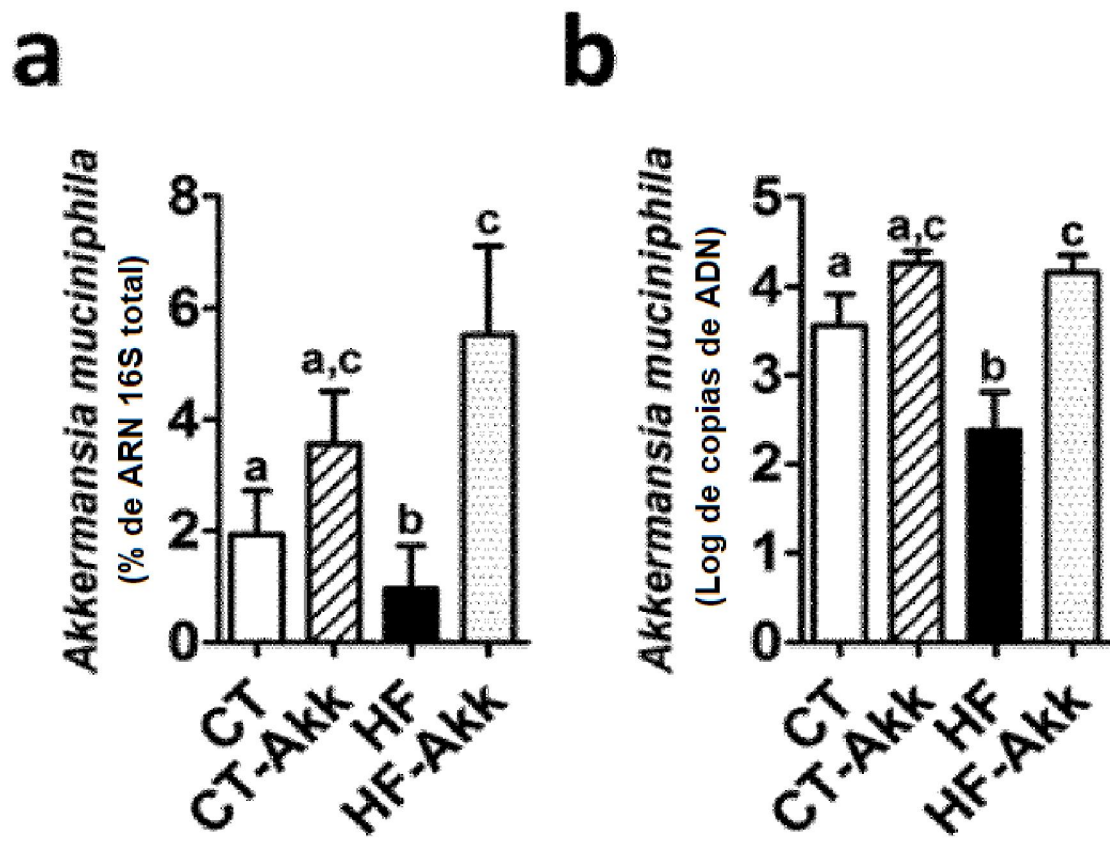


FIG. 4

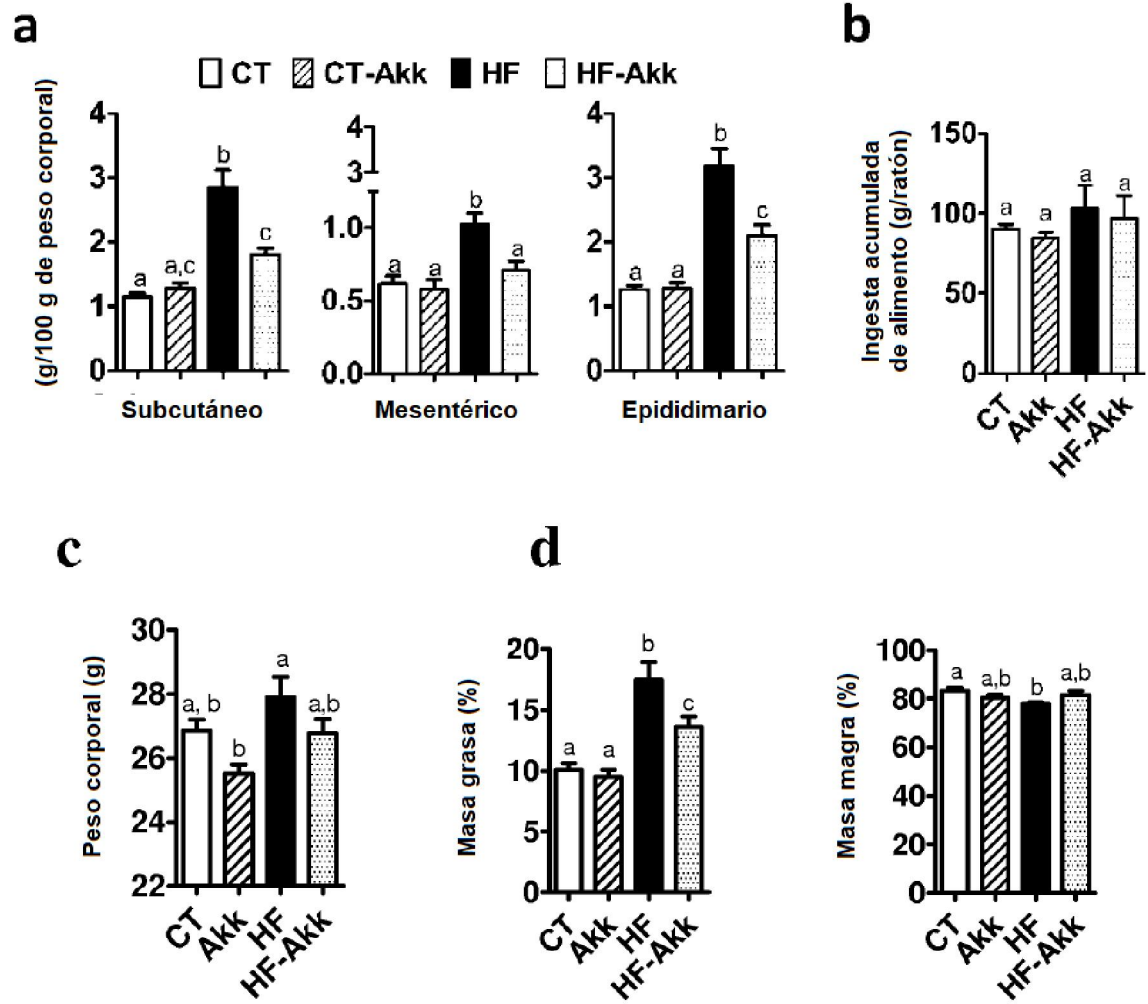


FIG. 5

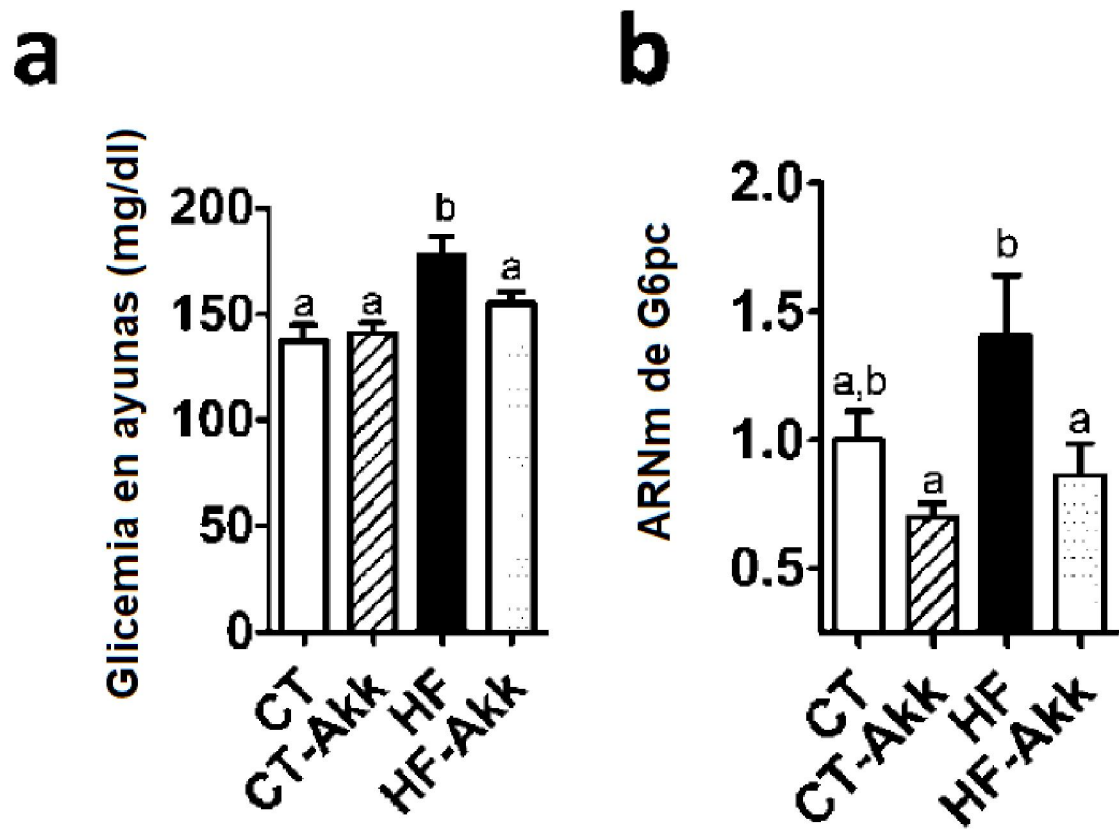


FIG. 6

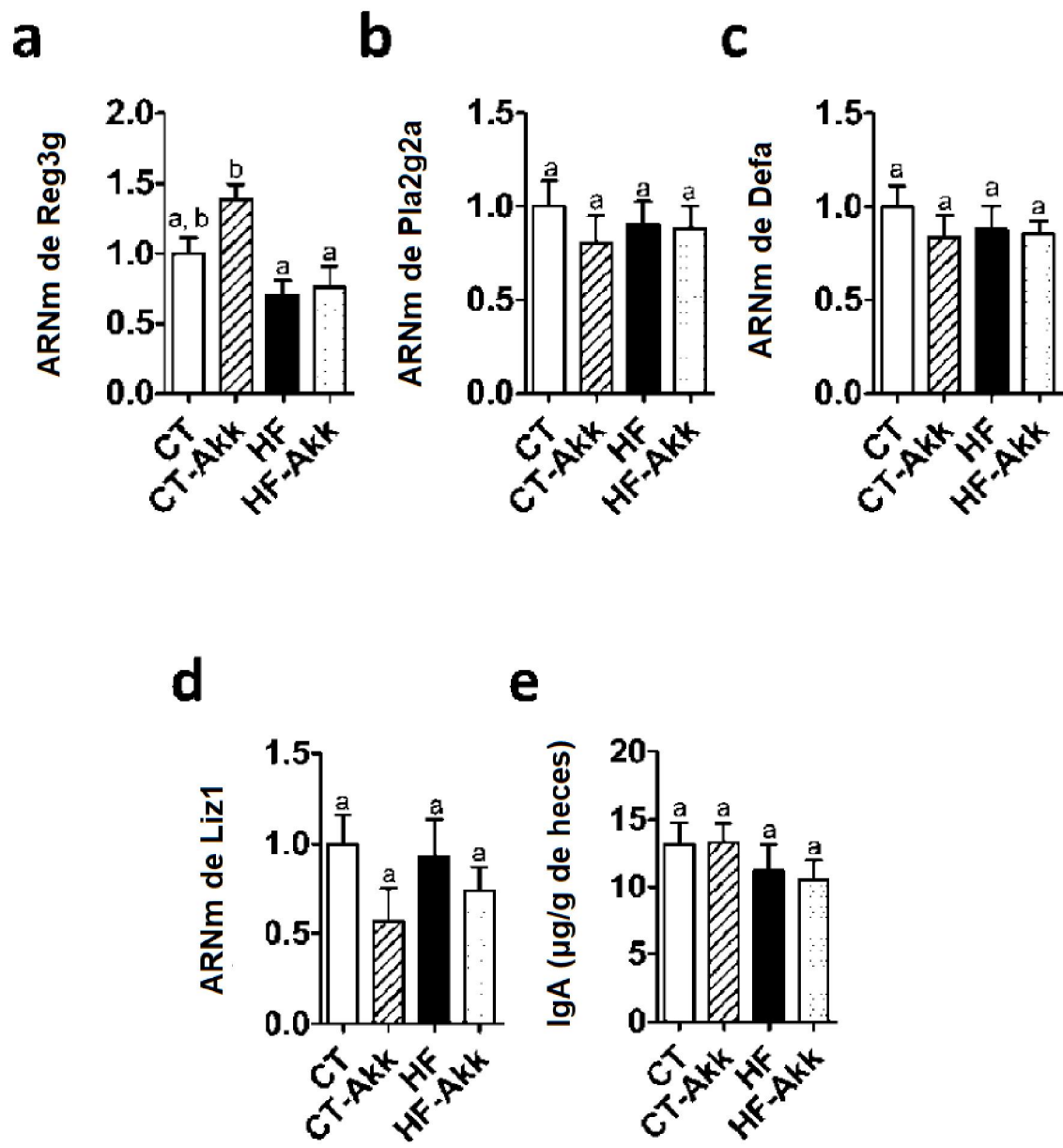


FIG. 7

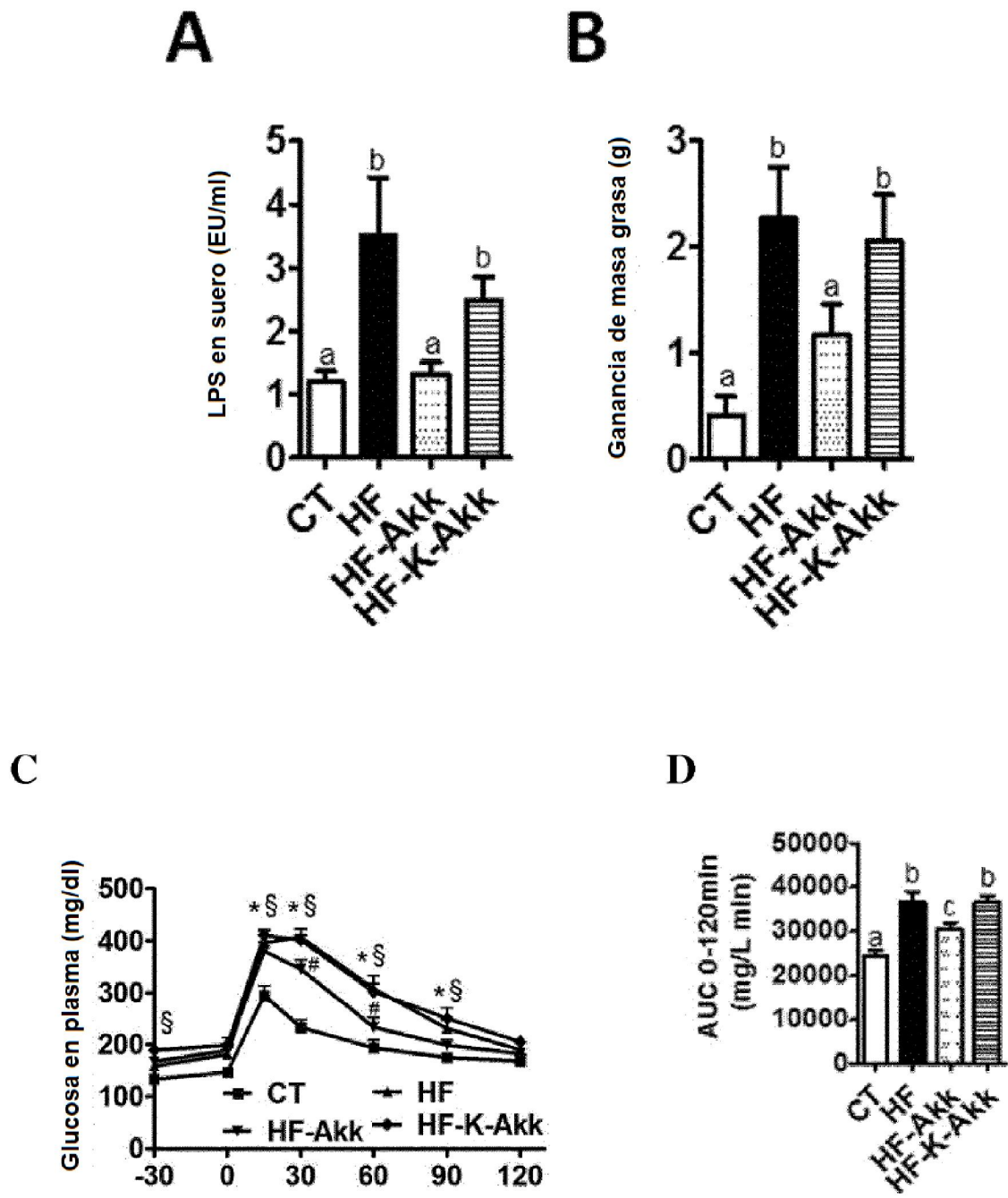
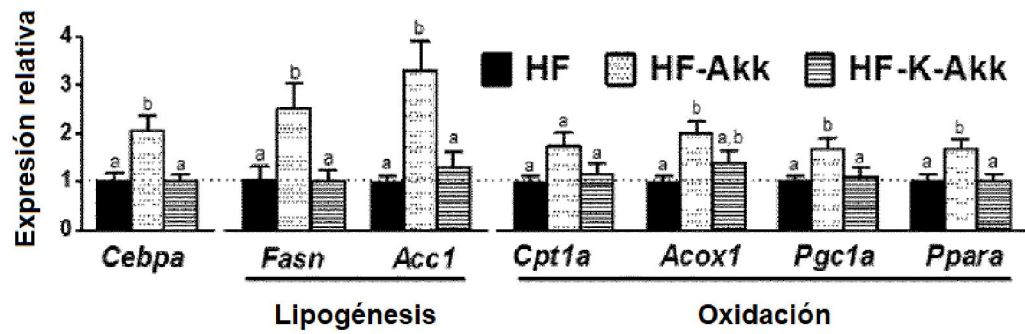
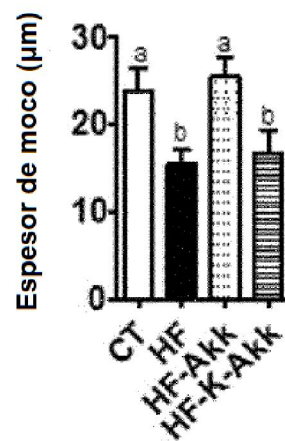


FIG. 8A-D

E



F



G

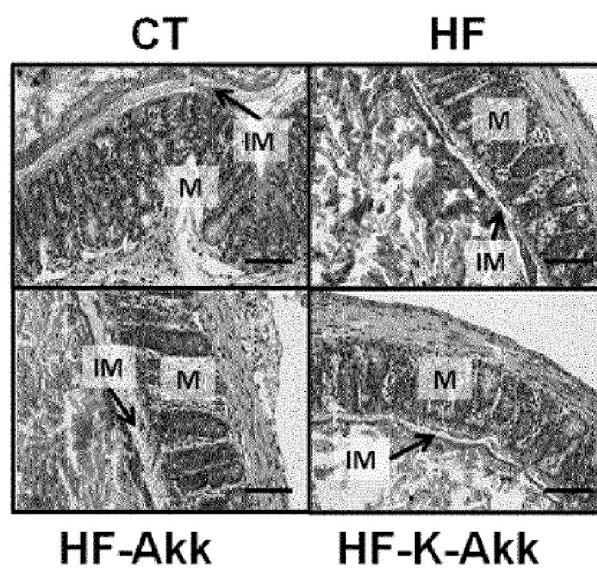


FIG. 8E-G

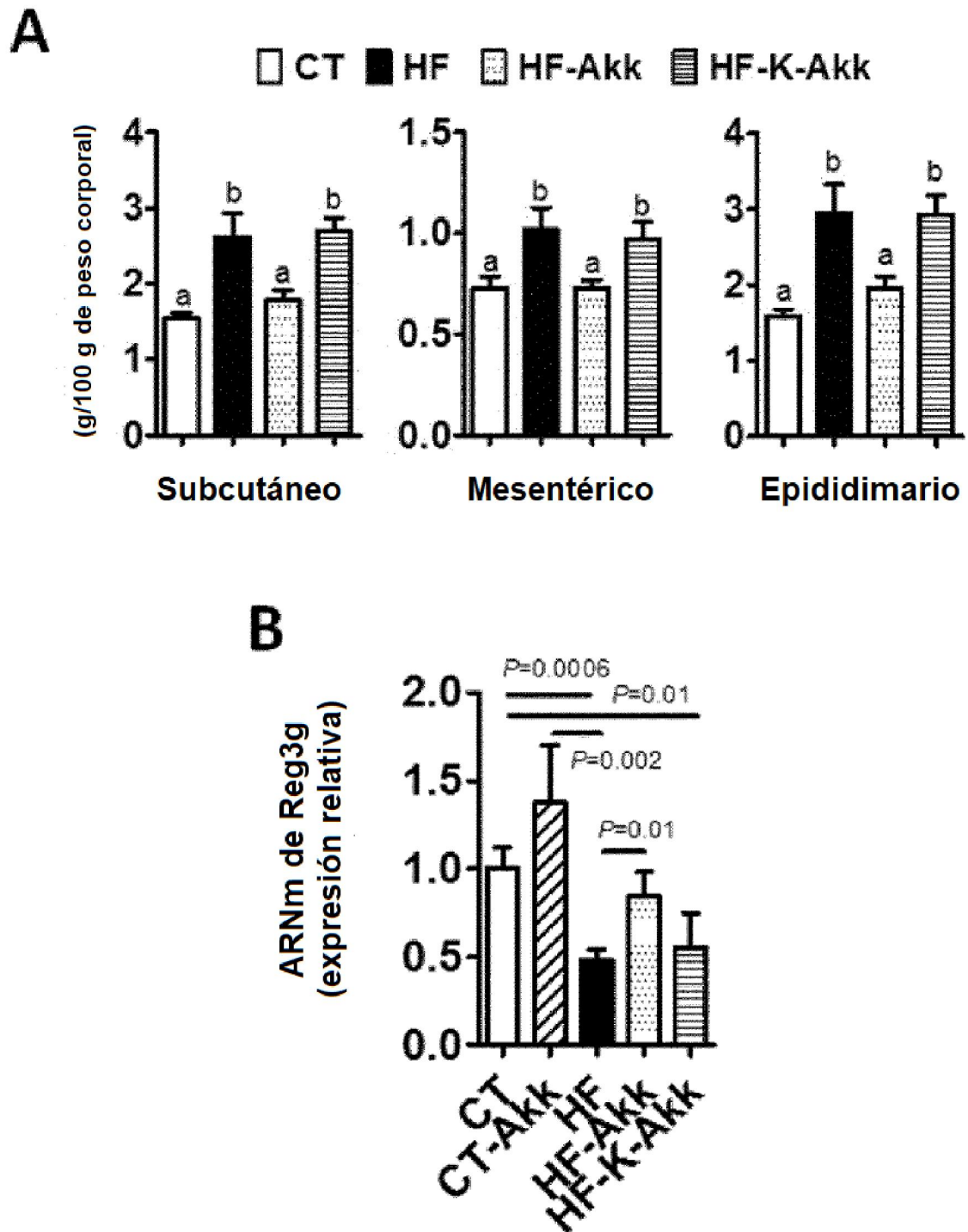


FIG. 9

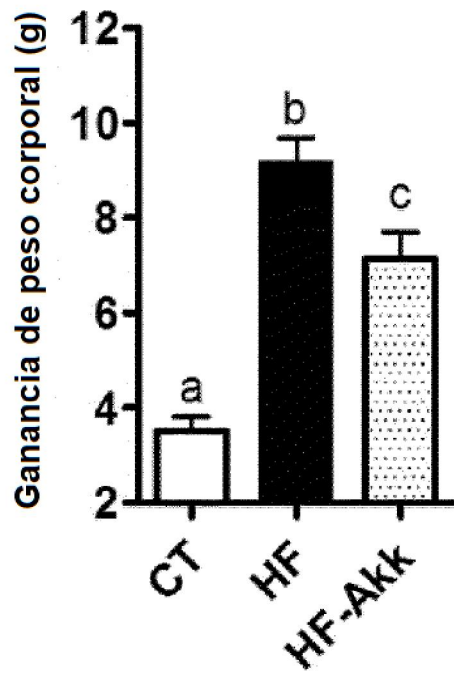
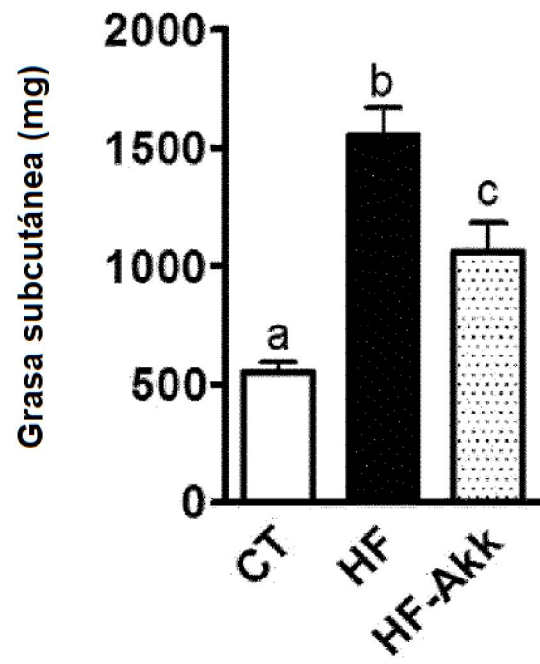
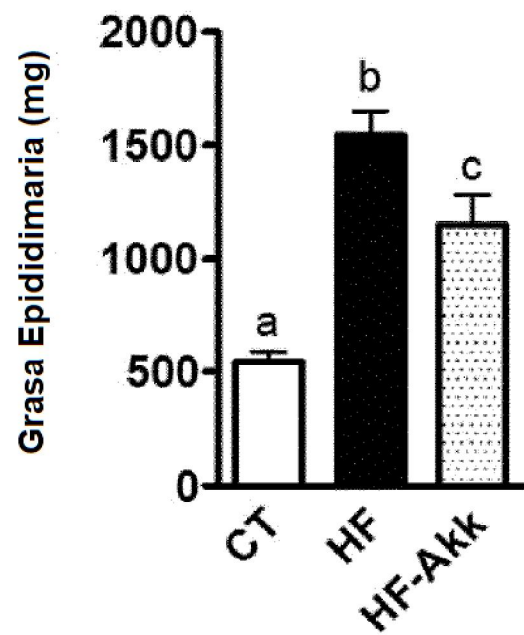
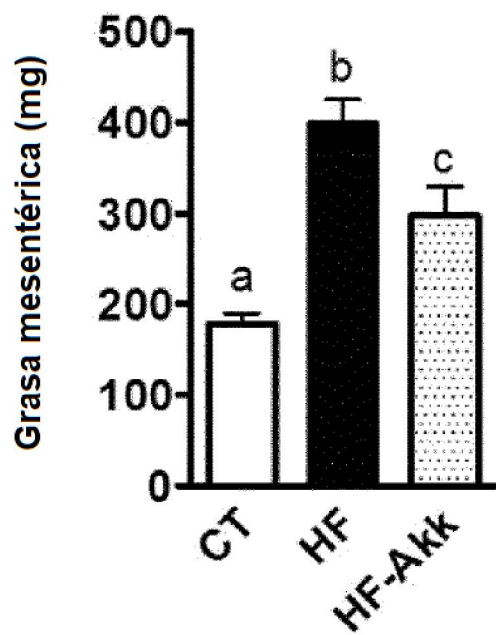
A**B****C**

FIG. 10

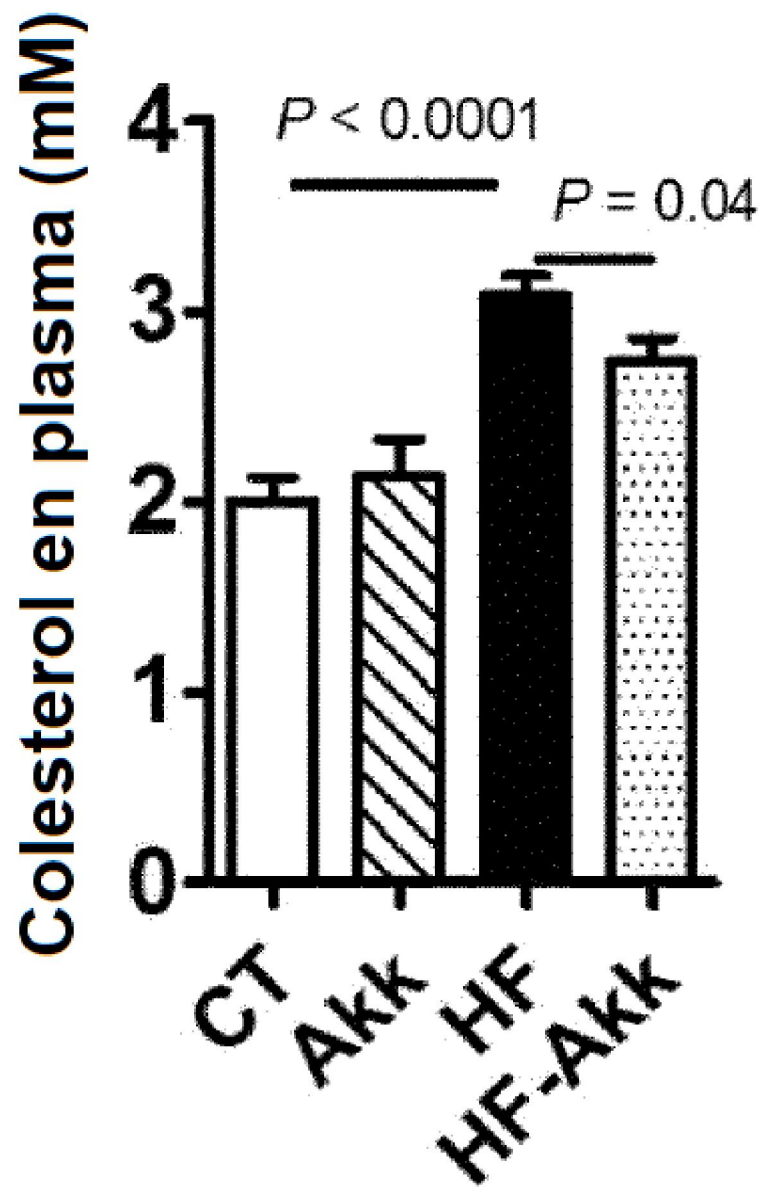


FIG. 11

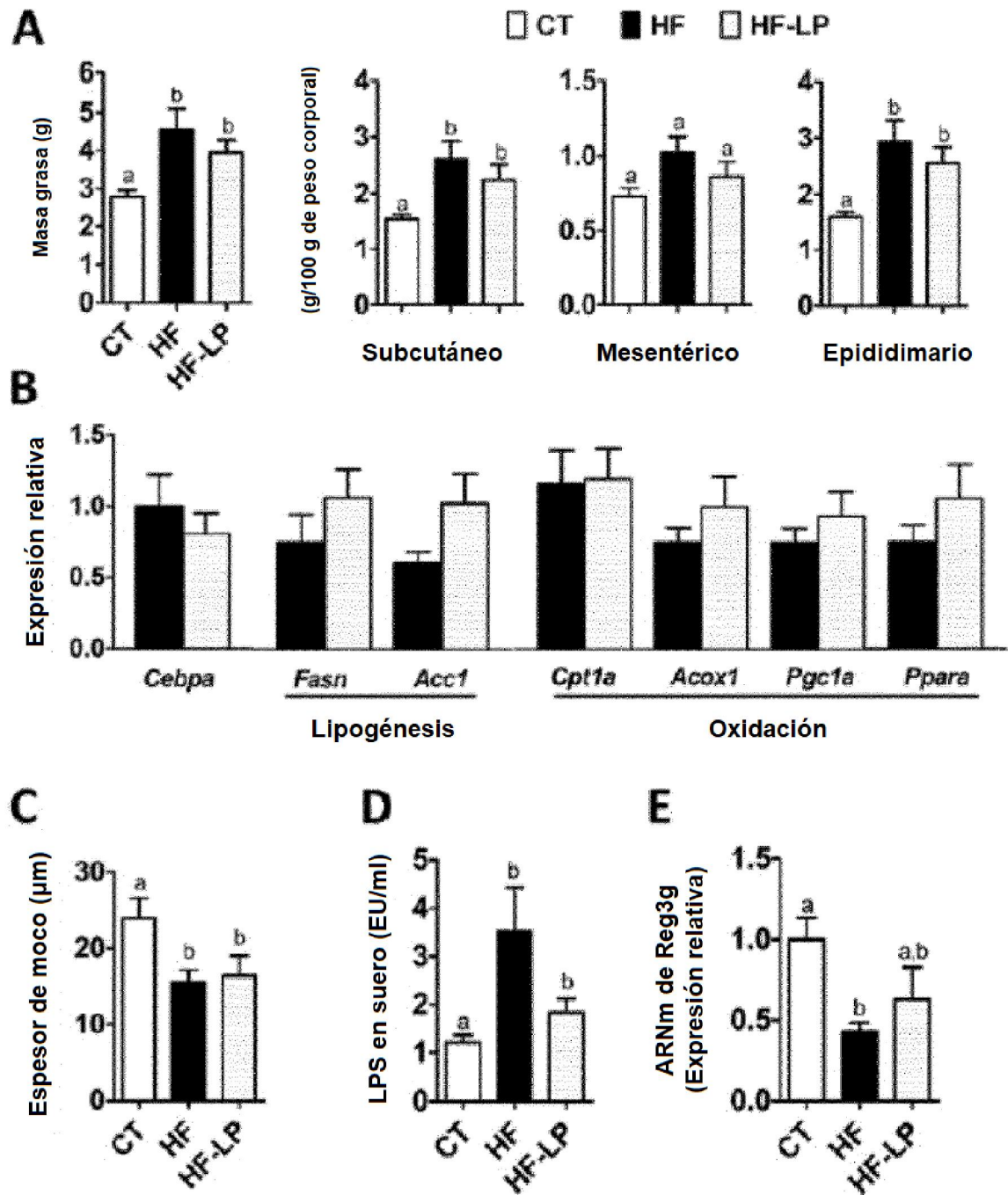


FIG. 12