

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 074**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014 PCT/JP2014/060812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14171478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014 E 14785100 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 3018199**

54 Título: **Composición que contiene una bacteria que pertenece al género Lactobacillus**

30 Prioridad:

17.04.2013 JP 2013086576

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

01.10.2018

73 Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)

1-40 Dojimahama 2-chome, Kita-ku

Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:

FUKUSHIMA, EIJI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 684 074 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

Composición que contiene una bacteria que pertenece al género *Lactobacillus*

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición que contiene una bacteria que pertenece al género *Lactobacillus*. Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición que contiene *Lactobacillus pentosus* novedoso.

Técnica anterior

10 Algunas bacterias del ácido láctico y bifidobacterias tienen actividades fisiológicas excelentes tales como una actividad reguladora del intestino y una actividad inmunoestimuladora, y se han usado en diversas aplicaciones dependiendo de las propiedades de las especies bacterianas. Entre ellas, recientemente se han desarrollado estudios sobre efectos para hacer dieta al tomar estas bacterias y se han realizado muchos informes.

15 Por ejemplo, la publicación de patente 1 informa de que la cepa ATCC53103 de *Lactobacillus rhamnosus* degrada un lípido (triacilglicerol) que es el causante de la obesidad, bloqueando de ese modo su absorción en el organismo. Además, se ha conocido que KB290 de *L. brevis*, que es un tipo de bacteria del ácido láctico vegetal, alcanza los intestinos en estado vivo, mostrando de ese modo tasas de viables intestinales y capacidad de supervivencia en el tracto intestinal excelentes (sin embargo, el número de bacterias excretadas es más pequeño que el número de bacterias ingeridas) (véase la publicación no de patente 1). Además, la siguiente publicación no de patente 2 ha informado de que la cepa L-92 de *Lactobacillus acidophilus* se recoge de las heces en una cantidad del 93% del número de bacterias ingeridas, de modo que la cepa tiene capacidad de supervivencia en el tracto intestinal excelente, y la siguiente publicación no de patente 3 ha informado de que se examina la capacidad de supervivencia de SBT2055 de *L. gasseri* en el tracto intestinal, y se administran 100 g de una leche fermentada que contiene de 1×10^6 a 5×10^6 ufc/g de las bacterias, y como resultado, las bacterias se detectan de las heces como máximo a 1×10^5 ufc/g más o menos.

25 Por otra parte, en cuanto a las bifidobacterias, se ha informado de que la cepa GCL2505 de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*, no sólo tiene capacidad de supervivencia en el tracto intestinal en el que la cepa alcanza los intestinos en estado vivo tras la ingestión oral, sino que también muestra una capacidad de proliferación notable dentro del tracto intestinal (véase la publicación de patente 2). La siguiente publicación no de patente 4 ha informado de que cuando se administra *B. animalis ssp. lactis* DN-173 010 a adultos, se detecta el 20% más o menos de DN-173 010 de las heces, en relación con el número de bacterias ingeridas.

30 Referencias de la técnica relacionada

Publicaciones de patente

Publicación de patente 1: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2011-206057

Publicación de patente 2: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2011-172506

Publicación de patente 3: Documento US 2005/0112112

35 Publicación de patente 4: Documento WO 2007/043933

Publicaciones no de patente

Publicación no de patente 1: "Physiological Function of Lactic Acid Bacteria for Human Health," 31 de agosto de 2007, CMC Publishing CO., LTD., 160-162

40 Publicación no de patente 2: Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 2001, 12, "Isolation and characterization of a *Lactobacillus acidophilus* strain L92 that can survive in human gastrointestinal tract," 28-35

Publicación no de patente 3: Microbiol. Immunol., 2006, 50, "Monitoring and survival of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in the human intestinal tract.," 867-870

45 Publicación no de patente 4: J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2008, 14, "Survival of *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 in the faecal microbiota after administration in lyophilized form o in fermented product - a randomized study in healthy adults," 128-136

Sumario de la invención

Problemas que va a resolver la invención

Sin embargo, puesto que la absorción de grasas tiene lugar principalmente en el intestino delgado, aunque *Bifidobacterium* que habitualmente prolifera en el intestino grueso muestra capacidad de proliferación en el tracto

intestinal, el bloqueo de la absorción de grasas no es suficiente. Además, se sabe que las bacterias del ácido láctico actúan anteriormente al intestino grueso, aunque todavía no se han realizado informes sobre las especies bacterianas que muestran capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que contiene bacterias del ácido láctico que muestran capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a una composición que contiene una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* (número de registro: NITE BP-1479), caracterizada porque la cepa tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

10 **Efectos de la invención**

Cuando se ingiere la composición de la presente invención, puesto que proliferan las bacterias del ácido láctico que tienen capacidad de proliferación en el tracto intestinal, se muestran algunos efectos excelentes de que la actividad fisiológica de las células bacterianas se mejora, lo que a su vez da como resultado la obtención de efectos para hacer dieta.

15 **Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados del examen en disoluciones intestinales artificiales.

[Figura 2] La figura 2 es un gráfico que muestra la transición de aumentos de peso, en la que las marcas de “*” en la figura muestran que hay una diferencia significativa ($p < 0,05$) basándose en el grupo de dieta rica en grasas.

20 [Figura 3] La figura 3 es un gráfico que muestra la cantidad de triglicéridos en sueros, en la que las marcas de “*” en la figura muestran que hay una diferencia significativa ($p < 0,05$) basándose en el grupo de dieta rica en grasas.

Modos para llevar a cabo la invención

25 La composición de la presente invención tiene una característica importante de que la composición contiene bacterias del ácido láctico de una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* (a continuación en el presente documento también denominadas las bacterias del ácido láctico de la presente invención), en la que la cepa tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

30 Las bacterias del ácido láctico de la presente invención son una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus*, caracterizada porque la cepa tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal. En este caso, la expresión “tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal” o “que prolifera en el tracto intestinal” tal como se usa en el presente documento significa que la cepa, tras haber sobrevivido en el tracto intestinal, prolifera en el intestino delgado y/o el intestino grueso, y preferiblemente en el intestino delgado, y el grado de capacidad de proliferación puede evaluarse como “proliferativo” en el caso en que el valor numérico sea diez veces o más de la DO_{660} en inoculación cuando la cepa se cultiva en una disolución intestinal artificial a 37°C durante 6 horas.

35 Los presentes inventores han examinado la capacidad de proliferación de aproximadamente 480 tipos de bacterias del ácido láctico propiedad de los presentes inventores en disoluciones intestinales artificiales, y han administrado suspensiones de las bacterias que pertenecen a *Lactobacillus pentosus* seleccionadas de las mismas a animales. Como resultado, los presentes inventores han encontrado que la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* tiene un número de bacterias excretadas significativamente mayor que el número de bacterias administradas. La presente invención se ha perfeccionado de ese modo.

40 La cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* se depositó en Patent Microorganisms Depository, National Institute of Technology and Evaluation, Incorporated Administrative Agency (2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, Japón) con la referencia de identificación de NRIC 0883, con el número de registro de NITE BP-1479 fechado con la fecha de depósito internacional de 10 de diciembre de 2012. La cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* se denomina a continuación en el presente documento simplemente cepa TUA4337L.

45 Las características bacteriológicas de la cepa TUA4337L se muestran en las tablas 1 y 2. La actividad de asimilación de azúcar de la tabla 2 son los resultados de medición usando un kit de identificación de bacterias API 50CH (BIOMETRIEUX). En este caso, “+” significa azúcar asimilado, y “-” significa azúcar no asimilado en la tabla 2.

[Tabla 1]

Tabla 1

Morfología bacteriana	<i>Bacillus</i>
Tinción de Gram	Positiva
Movilidad	Ausente

Esporas	Ausentes
Endosporas	Ausentes
Reacción de catalasa	Negativa
Crecimiento a 15°C	o
Crecimiento a 40°C	o
Crecimiento aeróbico	o
Crecimiento anaeróbico	o
pH en el crecimiento	3,0 – 12,5

[Tabla 2]

Tabla 2

Actividad de asimilación de azúcar		Actividad de asimilación de azúcar		Actividad de asimilación de azúcar	
Glicerol	+	D-Manitol	+	D-Rafinosa	+
Eritritol	-	D-Sorbitol	+	Almidón	-
D-Arabinosa	-	Metil- α D-Glucopiranosido	+	Glucógeno	-
L-Arabinosa	+	N-Acetilglucosamina	+	Xilitol	-
D-Ribosa	+	Amigdalina	+	Gentiobiosa	+
D-Xilosa	+	Arbutina	+	D-Turanosa	+
L-Xilosa	-	Citrato férrico-Aesculina	+	D-Lixosa	-
D-Adonitol	-	Salicina	+	D-Tagatosa	-
Metil- β D-xilopiranosido	-	D-Celobiosa	+	D-Fucosa	-
D-Galactosa	+	D-Maltosa	+	L-Fucosa	-
D-Glucosa	+	D-Lactosa	+	D-Arabitól	-
D-Fructosa	+	D-Melibiosa	+	L-Arabitól	-
D-Manosa	+	D-Sacarosa	+	Gluconato	+
L-Sorbosa	-	D-Trehalosa	+	2-Cetogluconato	-
Dulcitol	-	Inulina	-	5-Cetogluconato	-
Inositol	-	D-Melezitosa	-		

- 5 Tal como se describe en detalle en los ejemplos expuestos a continuación, la cepa TUA4337L tiene las características de aumentar el número de bacterias excretadas en comparación con el número de bacterias ingeridas, en otras palabras, que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal. Además, como capacidad de proliferación en el tracto intestinal, el número de bacterias tras un cultivo de 6 horas en una disolución intestinal artificial a 37°C es preferiblemente de 10 veces o más, más preferiblemente de 15 veces o más, incluso más preferiblemente de 20 veces o más, y todavía incluso más preferiblemente de 25 veces o más, el número de bacterias al comienzo de cultivo de las bacterias usadas como patrón.
- 10 Además, la secuencia del gen *recA* (SEQ ID NO: 1) codificada a partir de ADN extraído de la cepa TUA4337L tiene una homología del 99% con la secuencia del gen *recA* de la cepa IG1 de *Lactobacillus pentosus*. En este caso, la homología, tal como se usa en el presente documento, se muestra como el grado de similitud mediante puntuaciones que usan, por ejemplo, un programa de búsqueda BLAST usando el algoritmo desarrollado por Altschul *et al.* (The Journal of Molecular Biology, 215, 403-410 (1990)).
- 15 El medio de cultivo para la cepa TUA4337L no está limitado particularmente, y el medio incluye medios que contienen fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, nutrientes orgánicos y similares, habituales. Además, el cultivo puede realizarse con un medio de agar o un medio líquido. La temperatura de cultivo es preferiblemente de desde 10° hasta 45°C, más preferiblemente desde 15° hasta 42°C, incluso más preferiblemente desde 28° hasta 38°C, e incluso más preferiblemente desde 35° hasta 37°C, y un pH proliferativo es preferiblemente un pH de desde 3,0 hasta 12,5, y más preferiblemente un pH de desde 3,5 hasta 12,0.
- 20

La composición de la presente invención contiene una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal mencionada anteriormente en diversas formas.

- 25 Las formas de la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* contenida en la composición de la presente invención incluyen las propias bacterias del ácido láctico, incluyendo bacterias viables y bacterias muertas, inclusiones de bacterias del ácido láctico y células procesadas de bacterias del ácido láctico, y similares. Las bacterias viables pueden obtenerse de inclusiones de bacterias del ácido láctico tales como un medio de cultivo que contiene bacterias del ácido láctico. Las bacterias muertas pueden obtenerse, por ejemplo, sometiendo las bacterias viables a calentamiento, irradiación ultravioleta, tratamiento con formalina, un tratamiento con ácido o similares. Las bacterias viables o las bacterias muertas resultantes pueden producirse adicionalmente para dar células procesadas
- 30 sometiendo las bacterias a molienda, aplastamiento, o similares. En este caso, las bacterias del ácido láctico en cada una de las formas anteriores son preferiblemente bacterias viables desde el punto de vista de mostrar completamente los efectos de proliferación en el tracto intestinal, y las bacterias muertas pueden mezclarse con ellas.

Las bacterias del ácido láctico anteriores incluyen, por ejemplo, bacterias viables, bacterias húmedas, bacterias secas, y similares. Las inclusiones de bacterias del ácido láctico anteriores incluyen, por ejemplo, suspensiones de bacterias del ácido láctico, células cultivadas de bacterias del ácido láctico (incluyendo células bacterianas, sobrenadante y componentes de medio), y medios cultivados que contienen bacterias del ácido láctico (obtenidos retirando el contenido en sólido de las células de bacterias cultivadas). Además, las células de bacterias del ácido láctico procesadas anteriores incluyen, por ejemplo, células molidas, células aplastadas, células licuadas (extractos, etc.), concentrados, células de tipo pasta, células secadas (células secadas por pulverización, células liofilizadas, células secadas a vacío, células secadas en tambor, etc.), células diluidas, y similares.

La cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* en la presente invención puede usarse en forma individual o en una combinación de dos o más tipos de formas siempre que la cepa tenga capacidad de proliferación en el tracto intestinal. Aunque el contenido total en la composición de la presente invención no está limitado particularmente, el contenido total es habitualmente de desde el 0,00001 hasta el 99,9% (g/g), y de manera especialmente preferible desde el 0,0001% hasta el 50% (g/g) más o menos. Alternativamente, el número de células bacterianas está preferiblemente dentro del intervalo de desde $1,0 \times 10^2$ hasta $1,0 \times 10^{12}$ células/g, y más preferiblemente dentro del intervalo de desde $1,0 \times 10^6$ hasta $1,0 \times 10^{12}$ células/g. Las "células/g" anteriores pueden expresarse en bacterias viables como "UFC/g." Las bacterias del ácido láctico de la presente invención pueden usarse en combinación con una cepa que tiene una acción distinta de la acción de proliferación en el tracto intestinal.

La composición de la presente invención puede contener portadores, agentes basales y/o aditivos y similares que se usan habitualmente en el campo de los alimentos, en los campos de las formulaciones farmacéuticas y similares, dentro del intervalo que no afectaría a los efectos de la presente invención, siempre que la composición contenga una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal. Concretamente, la composición incluye diversos componentes tales como edulcorantes, acidificantes y vitaminas conocidos, y otros agentes tales como excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, correctivos, adyuvantes de disolución, suspensiones, agentes de recubrimiento y estabilizadores.

Además, la composición de la presente invención puede contener opcionalmente uno o más tipos de componentes conocidos tales como componentes cosméticos, y agentes para prevenir o mejorar enfermedades relacionadas con el estilo de vida, con el fin de añadir otras acciones útiles.

La forma de la composición de la presente invención no está limitada particularmente siempre que la composición esté en la forma en que la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal puede ingerirse en el organismo, y la forma se ejemplifica mediante bebidas o alimentos que contienen la cepa, desde el punto de vista de mostrar los efectos de la cepa, formas de comprimido que pueden ingerirse como suplementos, y similares, desde el punto de vista de ingerir convenientemente la composición. Los ejemplos concretos incluyen, por ejemplo, diversas formas tales como comprimidos, cápsulas, bebidas saludables, condimentos, alimentos procesados, postres y repostería. Entre estas formas, se prefieren las proporcionadas como alimentos fermentados. El alimento fermentado es un nombre genérico de alimento fermentado con bacterias del ácido láctico vegetales, y se incluyen bebidas en el mismo. Aunque los tipos de alimento fermentado no están limitados particularmente, el alimento fermentado incluye, por ejemplo, leches fermentadas, bebidas con bacterias del ácido láctico, leches de soja fermentadas, los obtenidos mediante la fermentación de frutas y verduras, tales como verduras en escabeche, kimchi, vinos, pasta de soja (miso) y salsa de soja; yogur de zumo de fruta fermentado en el que los zumos de fruta, zumos de verduras y similares están fermentados.

En este caso, la bebida o el alimento en el que se combinan las bacterias del ácido láctico de la presente invención, en otras palabras, la bebida o el alimento que contiene una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal, cuando se ingiere, muestra una gran acción de bloqueo de la absorción de grasas, en comparación con un caso donde se ingieren bacterias del ácido láctico que no tienen capacidad de proliferación en el tracto intestinal, y su acción continúa; por tanto, se considera que como alimento con pretensión de propiedades saludables o alimento saludable que tiene una acción continua de bloqueo de la absorción de grasas, es posible proporcionar una indicación de que tal bebida o alimento puede usarse para bloquear aumentos de peso o reducir el peso, o que puede usarse en la prevención de la obesidad o en la mejora de la obesidad, o que puede usarse adicionalmente para hacer dieta. El alimento con pretensión de propiedades saludables tal como se usa en el presente documento significa un alimento con pretensión de propiedades saludables ordenado por el Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar, que incluye alimento con pretensiones funcionales nutricionales y alimento para uso sanitario especificado, y el alimento con pretensión de propiedades saludables o alimento saludable puede ser cualquiera de los alimentos y bebidas.

La composición de la presente invención puede prepararse según un método conocido en el campo de los alimentos, el campo de las formulaciones farmacéuticas y similares, dependiendo de las formas de la misma.

La composición de la presente invención se fija de manera apropiada y no está en un nivel definitivo dependiendo de su forma, de los fines de la ingestión y de la edad, el peso corporal y los síntomas de los sujetos que se pretende que ingieran la composición, y, por ejemplo, es preferible que la composición se ingiera por vía oral en una cantidad, en lo que se refiere a la cantidad de bacterias del ácido láctico, de $1,0 \times 10^6$ células o más/kg de peso corporal al día, en de una única dosis a varias dosis divididas. Además, la cantidad de las células bacterianas ingeridas en un día

es, partiendo de una base en seco, preferiblemente de desde 0,00001 hasta 1 g, más preferiblemente de desde 0,0001 hasta 0,2 g, e incluso más preferiblemente de desde 0,0003 hasta 0,002 g, por aproximadamente 50 kg de peso corporal de un adulto. Por ejemplo, puesto que las bacterias del ácido láctico de la presente invención tienen la propiedad de bloquear la absorción de grasas, y tienen capacidad de proliferación en el tracto intestinal, la composición de la presente invención puede ingerirse junto con una dieta rica en grasas, o antes de una dieta rica en grasas, en una cantidad de modo que la cantidad de bacterias del ácido láctico estaría dentro del intervalo anterior. La composición puede ingerirse una vez al día en el desayuno, desde el punto de vista de mostrar de manera continua la acción de bloqueo de la absorción de grasas. El término "ingerido" tal como se usa en el presente documento significa "ingestión" y/o "administración."

Los sujetos que se pretende que ingieran la composición tal como se usa en el presente documento son preferiblemente seres humanos que necesitan una acción de bloqueo de la absorción de grasas, y pueden ser mascotas y similares.

Por tanto, mediante la ingestión de la composición de la presente invención, puede bloquearse la absorción de grasas a partir del tracto intestinal. Por tanto, la presente invención también proporciona un agente bloqueante de la absorción de grasas que comprende *Lactobacillus pentosus* que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal, para bloquear la absorción de una grasa derivada de la dieta a partir del tracto intestinal.

Además, la presente invención proporciona un método no terapéutico para bloquear la absorción de grasas, caracterizado porque el método comprende usar una composición que contiene la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* anterior en una cantidad eficaz en un individuo que necesita bloquear la absorción de grasas.

El individuo que necesita bloquear la absorción de grasas no está limitado particularmente siempre que el individuo sea un individuo con una enfermedad que se ha encontrado que tiene algunos efectos terapéuticos al bloquear la absorción de grasas. El individuo se ejemplifica, por ejemplo, mediante un individuo que tiene obesidad, o una enfermedad tal como diabetes, hiperlipidemia, hipertensión o arteriosclerosis producida por la obesidad. Además, para el fin de prevenir o mejorar la enfermedad anterior, el individuo anterior también incluye un individuo que está preocupado acerca de su peso corporal, un individuo que está preocupado acerca de su glucemia, un individuo que está preocupado acerca de la tensión arterial, y similares.

La cantidad eficaz se refiere a una cantidad que bloquea la absorción de grasas cuando la cepa TUA4337L se administra al individuo anterior, en comparación con un individuo sin administración. La cantidad eficaz concreta se fija apropiadamente y no es definitiva dependiendo de las formas de dosificación, de los métodos de administración, de los fines de uso y de la edad, el peso corporal, los síntomas y similares de los individuos. En este caso, se pretende que la administración abarque todas las realizaciones de administración, ingestión, medicación interna y bebida.

Ejemplos

La presente invención se describirá específicamente a continuación en el presente documento mediante los ejemplos, sin pretender limitar el alcance de la presente invención a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 < Examen usando la capacidad de proliferación en disolución intestinal artificial como índice >

Entre las bacterias del ácido láctico propiedad de los presentes inventores, se evaluó la capacidad de proliferación en una disolución intestinal artificial para aproximadamente 480 cepas que eran principalmente bacterias del ácido láctico vegetales (incluyendo cepas JCM).

Concretamente, en primer lugar, se inoculó cada una de las bacterias del ácido láctico de una reserva de glicerol en un medio MRS (Difco Laboratories) (10 ml) en una cantidad del 1% v/v cada una, y se cultivaron las células bacterianas a 35°C durante de 16 a 17 horas. A continuación, se midió la DO₆₆₀ de cada medio de cultivo (absorbancia a 660 nm) con un espectrofotómetro UV-1600 (Shimadzu Corporation) y se inocularon 100 µl de disolución preparada con el medio MRS de modo que la DO₆₆₀ de cada medio de cultivo sería de 10 en una disolución intestinal artificial (10 ml) de la composición mostrada a continuación en el presente documento. Después, se cultivaron las células bacterianas a 37°C durante 6 horas mientras se agitaba suavemente y entonces se midió la DO₆₆₀ para obtener las veces de proliferación (DO₆₆₀ tras 6 horas/DO₆₆₀ en la inoculación). Los resultados del examen representativos se muestran en la tabla 3 y en la figura 1.

< Disolución intestinal artificial (pH 6,45) >

Medio MRS	9 ml
Disolución de ácido biliar al 10% p/v (Wako Pure Chemical Industries, Ltd)	1 ml
Pancreatina al 1% p/v (de cerdo: SIGMA)	100 µL

En este caso, se usaron la disolución de ácido biliar y la disolución de pancreatina, que se hicieron estériles tratando

la disolución con una membrana de filtro de 0,22 µm (membrana de PVDF, fabricada por Millipore).

[Tabla 3]

Tabla 3

Género, especie	Cepa	DO ₆₆₀ después de 6 horas	Veces de proliferación (veces) (DO ₆₆₀ después de 6 horas/DO ₆₆₀ en la inoculación)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	TUA4337L (Presente invención)	2,93	2,93
	JCM1558	0,73	7,3
	1	1,55	15,5
	2	1,79	17,9
	3	1,54	15,4
	4	1,90	19,0
	5	1,68	16,8
	6	1,93	19,3
	7	1,60	16,0
	8	1,60	16,0
	9	1,78	17,8
	10	0,78	7,8
	11	1,68	16,8
	12	1,42	14,2
	13	1,37	13,7
14	0,96	9,6	
15	1,46	14,6	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	1,53	15,3
	16	1,63	16,3
	17	1,70	17,0
	18	1,42	14,2
	19	1,59	15,9
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	0,68	6,8
	20	1,18	11,8
	21	0,63	6,3
	22	0,58	5,8
	23	0,61	6,1
	24	0,65	6,5
<i>Lactobacillus casei</i>	JCM1134	0,14	1,4
	25	0,94	9,4
	26	0,10	1,0
	27	0,12	1,2
	28	0,12	1,2
	29	0,11	1,1
	30	0,13	1,3
<i>Lactobacillus fermentum</i>	JCM1173	0,27	2,7
	31	0,45	4,5
	32	0,45	4,5
	33	0,69	6,9
	34	0,93	9,3
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132		0,19	1,9
<i>Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus</i> JCM1012		0,06	0,6
<i>Lactobacillus gasserii</i> JCM1131		0,08	0,8
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM1120		0,07	0,7
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136		0,17	1,7

5 Como resultado, puede observarse que es más probable que las veces de proliferación sean altas en *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*, entre las que la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* tiene veces de proliferación especialmente altas y excelente capacidad de proliferación en el tracto intestinal.

Ejemplo 2 < Evaluación de la capacidad de proliferación *in vivo* en el tracto intestinal >

Se administró a ratones sometidos a una dieta rica en grasas a voluntad la cepa TUA4337L preparada tal como sigue, y se cuantificó el número de bacterias excretadas. Concretamente, se administró a ratones C57BL/6J (de 10

semanas de edad, machos) una única dosis con aproximadamente $1,0 \times 10^9$ células bacterianas del ácido láctico (correspondientes a 250 μ l de suspensión de células bacterianas) a las 10 en punto de la mañana (n=5), usando la muestra de administración preparada tal como sigue.

< Preparación de muestras de administración (muestras que contienen bacterias viables) >

- 5 [1] Inocular la cepa TUA4337L de una reserva de glicerol en un medio MRS (30 ml) en una cantidad del 1% v/v;
 [2] cultivar las células bacterianas (35°C, 20 horas);
 [3] centrifugar el medio de cultivo (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante y suspender en 30 ml de PBS(-);
 [4] centrifugar la suspensión de [3] (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de PBS(-);
 [5] contar el número de bacterias con un microscopio; y
- 10 [6] dispensar una disolución que contiene 20.000.000.000 de células a un tubo de centrifugación de 15 ml, centrifugar (8.000 rpm 5 min) la disolución para retirar el sobrenadante, y después suspender en 5 ml de un alimento líquido (dieta rica en grasas, 60% de Kcal de grasa: Research Diet) para preparar una suspensión de células bacterianas (se preparó alimento líquido con PBS(-)).

15 Después, se recogieron todas las deposiciones de porciones de dos días en 4 veces divididas (por la tarde del día en que comenzó la prueba, por la mañana y por la tarde del día siguiente y por la mañana del día después del día siguiente), se cuantificó el número de bacterias para todas las deposiciones mediante el método siguiente, y se calculó la tasa de aumento en la cepa TUA4337L en el intestino en cada uno de los ratones (el número de bacterias para todas las deposiciones/el número de bacterias administradas). Los resultados se muestran en la tabla 4.

<Método para medir el número de bacterias según PCR en tiempo real >

- 20 [1] Añadir 1 ml de PBS(-) a 100 mg de deposiciones (base en peso húmedo), y entonces alterar las heces con una espátula;
 [2] recoger una porción de 100 mg de las heces en un tubo Eppendorf (marca comercial registrada), centrifugar (15.000 rpm, 5 min) las deposiciones para retirar el sobrenadante, y suspender la precipitación en 1 ml de PBS(-) (realizándose dos veces los procedimientos de centrifugar a suspender);
- 25 [3] retirar el sobrenadante de la suspensión de [2], y después extraer el ADN de la suspensión con un kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit: QIAGEN) (llevándose a cabo la alteración celular repitiendo los procedimientos tres veces de añadir 300 mg de perlas de vidrio (de 150 a 212 μ m: SIGMA), 300 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y 900 μ l de tampón ASL (reactivos en el kit) a las deposiciones, centrifugar la mezcla con MULTI-BEADS SHOCKER MB-200 (YASUI KIKAI) a 3.000 rpm durante 1 minuto, y dejar en reposo en hielo durante 1 minuto); y
- 30 [4] cuantificar las bacterias del ácido láctico en el contenido del tracto intestinal según PCR en tiempo real en las condiciones mostradas a continuación en el presente documento:

((Condiciones para PCR en tiempo real))

35 (1) Se mezclaron diez microlitros de SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio), 0,8 μ l de cada cebador (10 μ M), 0,4 μ l del colorante II de referencia ROX, 6 μ l de agua estéril y 2 μ l de una disolución de ADN, para preparar una mezcla de reacción líquida para PCR. Como cebadores, se usaron los siguientes cebadores que detectan específicamente ADNr 16S de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* (siendo las secuencias de ADNr 16S de *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* idénticas en un 100%).

cebador 1: 5'-GCAAGTCGAACGAACTCTGGTATT-3' (SEQ ID NO: 2)

cebador 2: 5'-CGGACCATGCGGTCCAA-3' (SEQ ID NO: 3)

40 (2) Se realizó la PCR con el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems), que comprende, posteriormente a un tratamiento a 95°C durante 30 segundos, llevar a cabo un total de 60 ciclos de reacciones, en la que un ciclo consiste en 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 34 segundos. El número de copias por gramo del contenido del tracto intestinal se obtiene a partir de la intensidad de fluorescencia obtenida, la cantidad total del contenido del tracto intestinal y las veces de dilución.

45 (3) De manera separada, se obtiene el número de copias de ADNr 16S por célula, y el número de copias se convierte en el número de bacterias. En este caso, se confirma en los ratones a los que no se han administrado las bacterias del ácido láctico que no se detecta ni *Lactobacillus pentosus* ni *Lactobacillus plantarum* según la PCR anterior en tiempo real.

[Tabla 4]

Tabla 4

N.º de individuos	Número de bacterias de TUA4337L en las deposiciones (células)	Tasa aumentada (número de bacterias por deposiciones enteras/número de bacterias administradas)
1	$3,6 \times 10^9$	3,6
2	$1,9 \times 10^9$	1,9
3	$2,6 \times 10^9$	2,6
4	$1,6 \times 10^9$	1,6
5	$1,4 \times 10^9$	1,4
Media	$2,2 \times 10^9$	2,2

Ejemplo 3 < Efectos de bloqueo de los aumentos de peso >

5 Se agruparon ratones C57BL/6J (8 semanas de edad, machos) en cuatro grupos de un grupo con dieta habitual, un grupo con dieta rica en grasas, un grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables y un grupo con dieta rica en grasas + bacterias muertas (n = 10 cada uno), y se administró a cada uno de los grupos de manera continua las dietas tal como se muestra en la tabla 5 siguiente durante 32 días, y se midieron los pesos corporales diariamente y se calculó la media. La transición en la media se muestra en la figura 2. En este caso, se realizaron comparaciones entre grupos usando una prueba de la t con un nivel significativo de 0,05.

10 Concretamente, en lo que se refiere a la dieta, se administró a cada grupo de la tabla 5 cada una de una alimentación sólida a voluntad. Al grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables se le administró una muestra de administración preparada de la misma manera que en el ejemplo 2. Al grupo con dieta rica en grasas + bacterias muertas se le administró una muestra de administración preparada tal como sigue de modo que las bacterias del ácido láctico estaban contenidas en una cantidad de aproximadamente 1.000.000,000 células al día. Por otra parte, al grupo con dieta habitual se le administraron 250 µl de PBS(-) que no contenía las bacterias del ácido láctico, y al grupo con dieta rica en grasas se le administraron 250 µl de un alimento líquido que no contenía las bacterias del ácido láctico.

[Tabla 5]

Tabla 5

Grupo	Dieta	
	Dieta sólida	Bacterias del ácido láctico administradas
Grupo con dieta habitual	10% de Kcal de grasa	-
Grupo con dieta rica en grasas	60% de Kcal de grasa	-
Grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables	60% de Kcal de grasa	TUA4337L Bacterias viables
Grupo con dieta rica en grasas + bacterias muertas	60% de Kcal de grasa	TUA4337L Bacterias muertas

20 * 10% de Kcal de grasa (Research Diet)
60% de Kcal de grasa (Research Diet)

< Preparación de muestras de administración (muestras que contienen bacterias muertas) >

[1] Inocular la cepa TUA4337L en una cantidad del 1% v/v de una reserva de glicerol en un medio MRS (30 ml);

[2] cultivar las células bacterianas (35°C durante 20 horas);

25 [3] centrifugar el medio de cultivo (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y después suspender en 30 ml de PBS(-);

[4] centrifugar la suspensión de [3] (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y después resuspender en 5 ml de PBS(-);

[5] contar el número de bacterias con un microscopio;

30 [6] dispensar una disolución que contiene 20.000.000.000 de células a un tubo de centrifugación de 15 ml, centrifugar la disolución (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, después añadir 5 ml de un líquido gástrico artificial (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, pH 1,0) al mismo, agitar la mezcla y dejar en reposo durante 60 minutos; y

[7] centrifugar la disolución de [6] (8.000 rpm, 5 min) para retirar el sobrenadante, y después suspender en 5 ml de un alimento líquido (60% de Kcal de grasa) para preparar una suspensión de células bacterianas.

35 Como resultado, el grupo al que se administraron las bacterias viables TUA4337L mostró un efecto significativo de bloqueo de los aumentos de peso, en comparación con el control (el grupo con dieta rica en grasas). Además, la

administración de bacterias viables fue más eficaz que la administración de bacterias muertas. Se considera que la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* proliferó en el tracto intestinal, influyendo de ese modo eficazmente en el huésped.

Ejemplo 4 < Efectos de bloqueo de la absorción de grasas >

5 Se continuó administrando a los constituyentes del grupo con dieta habitual, el grupo con dieta rica en grasas y el grupo con dieta rica en grasas + bacterias viables en el ejemplo 3 (n = 12 cada uno) el mismo contenido que las dietas en el ejemplo 3 durante 2 semanas. Después, se dejaron en ayunas los grupos durante la noche y se les administró aceite de oliva (Nacalai Tesque) (5 ml/kg), y se diseccionaron adicionalmente tras 3 horas para recoger los sueros de la vena cava. Se midieron los triglicéridos (TG) en los sueros con Triglyceride E-Test Wako (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.). Los resultados se muestran en la figura 3. En este caso, las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un criterio de diferencia significativa mediante una prueba de la t con un nivel significativo de 0,05.

15 Como resultado, se encontró que el grupo con dieta rica en grasas mostraba la clara posibilidad de aumentar los TG en la sangre en comparación con el grupo con dieta habitual. Por tanto, se considera que si se continúa ingiriendo una dieta rica en grasas, un cuerpo absorbería las grasas más fácilmente. Además, se encontró que el grupo al que se administraron bacterias viables TUA4337L tenía bloqueado el aumento en los TG en la sangre, en comparación con el control (grupo con dieta rica en grasas). Por tanto, se considera que uno de los mecanismos de los efectos del bloqueo de los aumentos de peso es el bloqueo de la absorción de grasas, que fue eficaz incluso tras un día desde la administración de las bacterias viables TUA4337L, de modo que se considera que muestra efectos de manera continua.

20 A continuación en el presente documento se facilitan a modo de ejemplo formulaciones concretas de la composición que contiene una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* de la presente invención.

[Ejemplo de producción 1: Comprimido]

25 Se produce un medicamento que contenía la cepa TUA4337L (comprimido) según un método mostrado a continuación en el presente documento.

Se mezcla la cantidad de 66,7 g de un producto molido seco de una cepa TUA4337L junto con 232,0 g de lactosa y 1,3 g de estearato de magnesio, y se somete la mezcla a preparación de comprimidos con una máquina de preparación de comprimidos de un solo punzón, para producir un comprimido que tiene un diámetro de 10 mm y un peso de 300 mg.

30 [Ejemplo de producción 2: Yogur]

35 Se prepara una mezcla obtenida mezclando leche, leche desnatada en polvo y agua, y se esteriliza la mezcla con calentamiento, se enfría hasta 40°C más o menos y se inocula con una cepa TUA4337L como material iniciador, y se deja en reposo en una cámara de fermentación para que fermente. En este caso, puede seleccionarse apropiadamente la temperatura de fermentación mientras se deja en reposo. Además, con el fin de controlar que la concentración de oxígeno que permanece disuelto al comienzo de la fermentación sea baja, la mezcla de fermentación puede someterse a un tratamiento de sustitución con un gas inerte tal como nitrógeno. La leche fermentada con TUA4337L así obtenida se añade a una leche disponible comercialmente y se deja en reposo durante 3 días para preparar yogur.

[Ejemplo de producción 3: Bebida con bacterias del ácido láctico]

40 Los materiales de partida mostrados en la tabla 6 se mezclan usando una cepa TUA4337L para preparar una bebida con bacterias del ácido láctico.

[Tabla 6]

Tabla 6

Composición	Partes en peso
Leche fermentada con TUA4337L que contiene un 21% de contenido en sólidos de leche	14,76
Azúcar líquido de fructosa-glucosa	13,31
Pectina	0,5
Ácido cítrico	0,08
Aroma	0,15
Agua	71,2
Cantidad total	100

[Ejemplo de producción 4: Bebida fermentada con zumo de frutas y bebida fermentada con zumo de verduras]

Se inocula TUA4337L en una cantidad del 2% en peso en zumo de melocotón y se cultiva a 30°C durante 38 horas, para producir un zumo de frutas fermentado de melocotón. Además, se fermenta un zumo de zanahorias de la misma manera para producir un zumo fermentado de zanahorias.

Aplicabilidad industrial

- 5 Puesto que la composición de la presente invención contiene bacterias del ácido láctico que tienen capacidad de proliferación en el tracto intestinal, cuando se ingiere en el cuerpo, las bacterias del ácido láctico sobreviven al tracto intestinal y proliferan, por lo que puede bloquearse la absorción de grasas, y pueden bloquearse los aumentos de peso, de modo que la composición puede usarse de manera adecuada para los fines de los efectos de hacer dieta.

Texto libre de secuencias

- 10 SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias es una secuencia de nucleótidos de *recA* de *Lactobacillus pentosus* TUA4337L.

SEQ ID NO: 2 de la lista de secuencias es una secuencia de nucleótidos de un cebador específico de *Lactobacillus pentosus/plantarum*.

- 15 SEQ ID NO: 3 de la lista de secuencias es una secuencia de nucleótidos de un cebador específico de *Lactobacillus pentosus/plantarum*.

Lista de secuencias

<110> SUNTORY HOLDINGS LIMITED

- 20 <120> Composición que contiene una cepa de *Lactobacillus*

<130> 14-013-PCTJP

<150> Documento JP 2013-86576

- 25 <151> 17-04-2013

<160> 3

<170> PatentIn versión Ver. 3.3

- 30 <210> 1

<211> 535

<212> ADN

<213> *Lactobacillus pentosus* 4337L

- 35 <220>

<223> un gen que codifica para *recA* de *Lactobacillus pentosus* 4337L

<400> 1

```

gcgattatgc ggatgggtga cgctgcccag acgaccattt caacaatttc cagcgggtca      60
ctagccttag atgacgcatt aggcgttggg ggttacccac gtggccgaat cgttgaaatt      120
tatggccctg aaagttccgg taaaacgacc gttgcactac acgcggtcgc tgaagttcaa      180
aagcaaggcg ggacggccgc ctatatcgat gctgaaaacg ccttggatcc ggtttacgcg      240
gaacatttag gtgtcaacat tgatgatttg ttactttcac aaccagatac tggatgaaca      300
ggtcttgaaa tcgcggatgc tttagtttcc agtggcgcgg ttgatattct agttgtcgat      360
tcagttgcgg cgttagtacc acgggccgaa attgaagggtg aaatgggtga cgcccacggt      420
ggnttacaag cccggttaat gncacaagcg ttgcggaagt tatccgggac tttgaacaag      480
acaaagacca tcgcactatt tattaaccaa attcgtgaaa aagttggcgt gatgt      535
    
```

- 40 <210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

- 45 <220>

<223> cebador para *Lactobacillus pentosus*

<400> 2

gcaagtcgaa cgaactctgg tatt 24

<210> 3

<211> 17

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> cebador para *Lactobacillus pentosus*

<400> 3

cggaccatgc ggtccaa 17

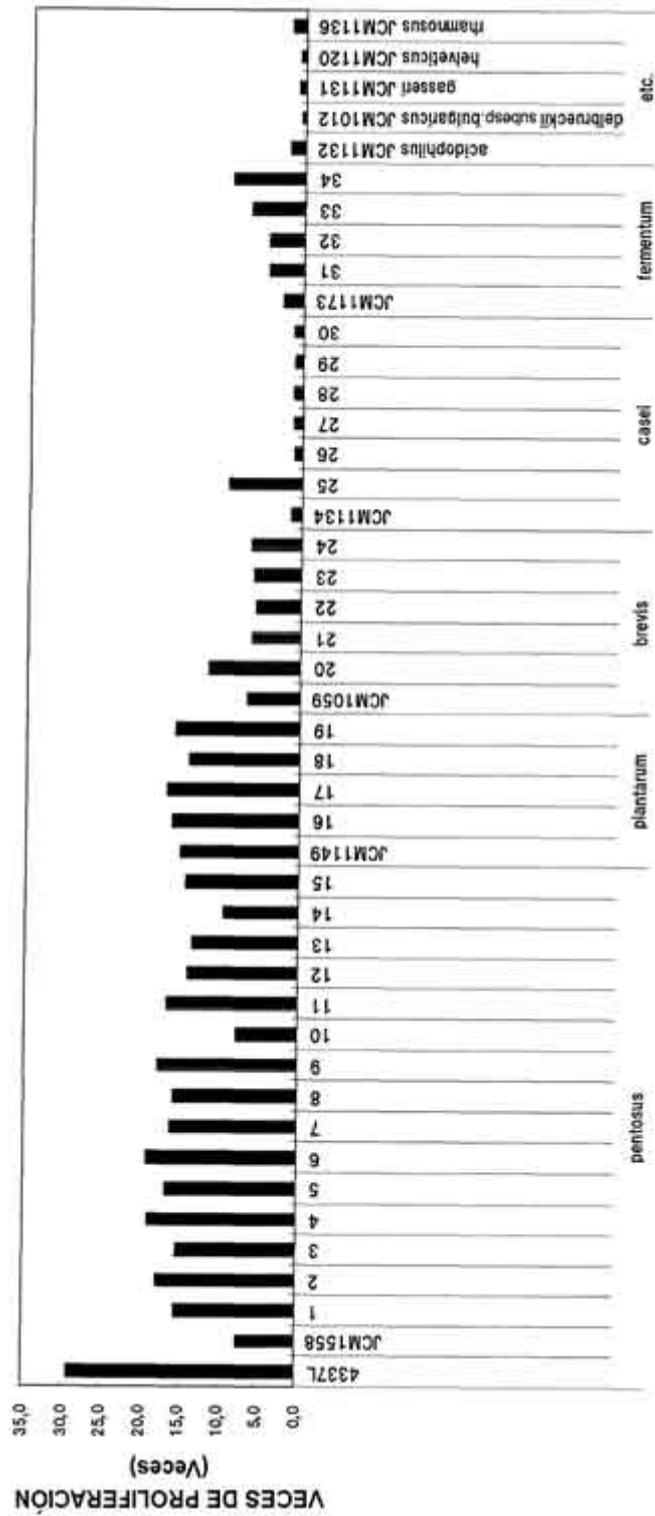
15

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* (número de registro: NITE BP-1479) que tiene capacidad de proliferación en el tracto intestinal.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición tiene una acción de bloqueo de la absorción de grasas a partir del tracto intestinal.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que se bloquea la absorción de grasas producida por una dieta rica en grasas en el tracto intestinal.
- 10 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que cuando se ingiere, la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* prolifera en el tracto intestinal, mostrando de ese modo una mayor acción de bloqueo de la absorción de grasas, en comparación con un caso donde se ingieren bacterias de ácido láctico que no tienen capacidad de proliferación.
- 15 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que cuando se ingiere, la cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* prolifera en el tracto intestinal, y de ese modo continúa una acción de bloqueo de la absorción de grasas, en comparación con un caso donde se ingieren bacterias de ácido láctico que no tienen capacidad de proliferación.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición se usa para bloquear aumentos de peso o reducir el peso.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la prevención de la obesidad o la mejora de la obesidad.
- 20 8. Composición para su uso según la reivindicación 7, en la que la composición se usa junto con una dieta rica en grasas, o se usa antes de tomar una dieta rica en grasas.
9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición es una bebida o un alimento.
10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición es yogur.
- 25 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición es un agente bloqueante para la absorción de grasas derivadas de dietas a partir del tracto intestinal.
12. Composición para su uso según las reivindicaciones 7 a 8, en la que la composición se ingiere una vez al día en el desayuno.
- 30 13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 9 a 11, en la que la composición es para hacer dieta.
14. Composición que comprende una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* (número de registro: NITE BP-1479), para su uso en el bloqueo de la absorción de grasas.
- 35 15. Método no terapéutico para bloquear la absorción de grasas, que comprende la etapa de administrar una composición que comprende una cepa TUA4337L de *Lactobacillus pentosus* (número de registro: NITE BP-1479) en una cantidad eficaz a un individuo que necesita bloquear la absorción de grasas.

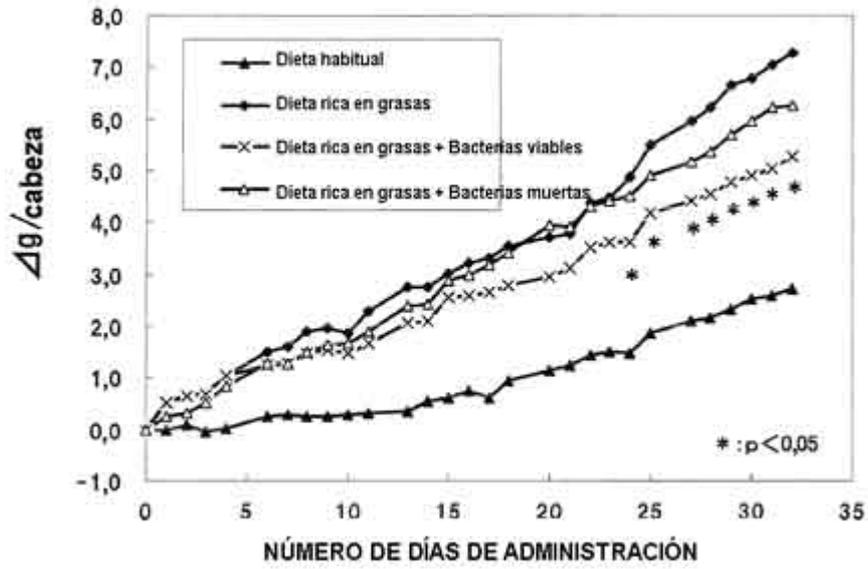
[FIG. 1]

FIG. 1



[FIG. 2]

FIG. 2



[FIG. 3]

FIG. 3

