

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 960**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/135</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/747</b>	(2015.01)
<b>A61P 3/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/06</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/225</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2015 PCT/JP2015/058750**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15146916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2015 E 15770338 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3135753**

54 Título: **Nueva cepa de Lactobacillus paracasei**

30 Prioridad:

**24.03.2014 JP 2014060010**

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

**24.06.2020**

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
2-9, Kanda Tsukasa-machi Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8535 , JP**

72 Inventor/es:

**IKENAGA, TAKESHI;  
NODA, TSUNEYUKI;  
NOGUCHI, HIROKI;  
UEDA, ATSUSHI;  
KOUUDA, NORIYUKI y  
TAJIRI, YOSHITO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 768 960 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

Nueva cepa de *Lactobacillus paracasei*

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* (cepa WON0604: FERM BP-11468) que tiene actividad promotora de producción de poliaminas en un organismo, así como a su aplicación y a tecnologías relevantes.

10

**Antecedentes de la técnica**

Poliamina es un nombre general para hidrocarburos alifáticos que tienen dos o más grupos amino primarios. Los ejemplos típicos de poliamina incluyen putrescina, espermidina, espermina y similares. La poliamina se sintetiza en las células de todos los organismos, y está implicada en la diferenciación o proliferación celular. Además de estas actividades, existen informes recientes de que la poliamina tiene diversas actividades fisiológicas útiles, que incluyen un efecto antienviejimiento (documento no de patente 1), una actividad de retardo de la progresión de arterioesclerosis (documento no de patente 2), una actividad supresora de inflamación aguda y crónica (documento no de patente 3), una actividad de reducción de grasa neutra, una actividad de mejora de resistencia a la insulina, una actividad antiobesidad, una actividad de disminución del nivel de colesterol, una actividad de aumento del metabolismo basal (documento no de patente 4) y una actividad antialérgica (documento no de patente 5).

La biosíntesis de poliaminas se produce en todos los animales, incluyendo humanos; sin embargo, esta capacidad de síntesis disminuye con el envejecimiento. Por tanto, con el fin de recibir la actividad fisiológica útil de poliaminas a lo largo de la vida, ha habido debates en cuanto a la ingesta o administración externa de poliamina, o la activación de la capacidad de síntesis de poliaminas en un organismo.

Hasta la fecha, se han sugerido varios alimentos y bebidas que contienen poliamina. Por ejemplo, el documento de patente 1 divulga alimentos y bebidas que contienen poliamina extraída de diversas materias primas de origen vegetal/animal. Se espera que tales alimentos y bebidas promuevan la síntesis de poliaminas en organismos (en particular, en humanos), y proporcionen de ese modo las diversas actividades fisiológicas útiles mencionadas anteriormente, tales como un efecto antienviejimiento, una actividad de retardo de la progresión de arterioesclerosis, una actividad supresora de inflamación aguda y crónica, una actividad de reducción de grasa neutra, una actividad de mejora de resistencia a la insulina, una actividad antiobesidad, una actividad de disminución del nivel de colesterol, una actividad de aumento del metabolismo basal o una actividad antialérgica. Además, se espera que tales alimentos y bebidas actúen, por ejemplo, en la mejora, retención u homeostasis de biomarcadores o similares relevantes para las actividades fisiológicas anteriores, o en la prevención del desarrollo de enfermedades.

El documento de patente 2 y los documentos no de patente 6-8 divulgan cepas de *Lactobacillus paracasei* que tienen actividad promotora de producción de poliaminas, actividad de reducción de grasa neutra hepática y/o actividad promotora del metabolismo energético. El documento de patente 3 y el documento no de patente 9 divulgan cepas de *Lactobacillus paracasei* que tienen actividad de disminución del nivel de colesterol. El documento de patente 4 y el documento no de patente 10 divulgan cepas de *Lactobacillus plantarum* que tienen actividad promotora de producción de poliaminas.

**Lista de referencias**Documentos de patente

50

Documento de patente 1: JP2010-263816A

Documento de patente 2: JP2009-102270A

55

Documento de patente 3: JP2007-189973A

Documento de patente 4: WO 2009/138092 A1

Documentos no de patente

60

Documento no de patente 1: Eisenberg T. *et al.*, Nat Cell Biol 2009; 11 (11): 1305-1314

Documento no de patente 2: Soda K., Med. Hypotheses, 2010; 75 (3): 299-301

65

Documento no de patente 3: Lagishetty C.V. *et al.*, Indian J. Pharmacol. 2008; 40 (3): 121-125

Documento no de patente 4: Koponen T. *et al.*, Amino Acids 2012; 42 (2-3): 427-40.

Documento no de patente 5: Peulen O. *et al.*, Public Health Nutr. 1998; 1 (3): 181-184

5 Documento no de patente 6: Chorell E. *et al.*, Bristish J. Nutr. 2013; 110 (1): 116-126

Documento no de patente 7: Martin F.-P. J. *et al.*, J. Proteome Res. 2007; 6 (4): 1471-1481

Documento no de patente 8: Nerstedt A. *et al.*, Brit. J. Nutr. 2007; 97 (6): 1117-1127

10 Documento no de patente 9: Tanaka-Azuma Y. *et al.*, Nippon Shokubin Kagaku Kogaku Kaishi 2009; 56 (3): 177-183

Documento no de patente 10: Sharafedinov K. K. *et al.*, Nutr. J. 2013; 12:138 págs. 1-11

## 15 **Sumario de la invención**

### Problema técnico

20 Un objeto que va a lograrse mediante la presente invención es proporcionar un medio eficaz para promover la síntesis de poliaminas en organismos (en particular, en organismos humanos).

### Solución al problema

25 En un intento de lograr el objeto anterior, los inventores de la presente invención encontraron, entre los microorganismos que pertenecen a *Lactobacillus paracasei*, un microorganismo capaz de promover la producción de poliaminas en organismos humanos y animales. Los inventores de la presente invención encontraron que este microorganismo tiene actividad promotora de producción de poliaminas en el intestino delgado, así como actividad de reducción de grasa neutra hepática y/o actividad promotora del metabolismo energético.

30 Los ejemplos representativos de la presente invención se detallan a continuación.

Elemento 1.

35 Cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 depositada como FERM BP-11468.

Elemento 2.

40 Cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 según el elemento 1, que tiene además actividad de reducción de grasa neutra hepática.

Elemento 3.

45 Cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 según el elemento 1 ó 2, que tiene además actividad promotora del metabolismo energético.

Elemento 4.

50 Una composición a la que se le ha añadido la cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 según uno cualquiera de los elementos 1 a 3.

Elemento 5.

La composición según el elemento 4, en la que la composición es un promotor de la producción de poliaminas.

55 Elemento 6.

Un agente para prevenir o tratar al menos una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica y cirrosis hepática, comprendiendo el agente el *Lactobacillus paracasei* según el elemento 2.

60 Elemento 7.

Un agente para reducir la grasa neutra hepática, que comprende el *Lactobacillus paracasei* según el elemento 2.

65 Elemento 8.

Un método para promover la producción de poliaminas en un humano que necesita un potenciamiento de la producción de poliaminas, que comprende administrar la cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 según uno cualquiera de los elementos 1 a 3 a un humano.

5 Elemento 9.

Un método para tratar o mejorar un paciente con esteatosis hepática, que comprende administrar la cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 según el elemento 2 al paciente con esteatosis hepática.

10 Elemento 10.

Uso del *Lactobacillus paracasei* según el elemento 2 para la elaboración de un agente para prevenir y/o tratar esteatosis hepática.

15 Efectos ventajosos de la invención

La cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 depositada como FERM BP-11468 (esta cepa puede denominarse a continuación en el presente documento "el microorganismo de la presente invención") de la presente invención tiene actividad promotora de producción de poliaminas en organismos de humanos u otros animales. En la presente invención, esta actividad se denomina "actividad promotora de producción de poliaminas". Usando el microorganismo de la presente invención (por ejemplo, a través de ingesta o administración), es posible promover la producción de poliaminas en un organismo humano o animal. Por consiguiente, la invención permite que un humano o un animal reciba de manera eficaz actividades fisiológicas útiles de poliamina (por ejemplo, un efecto antienvjecimiento, una actividad de retardo de la progresión de arterioesclerosis, una actividad supresora de inflamación aguda y crónica, una actividad de reducción de grasa neutra, una actividad de mejora de resistencia a la insulina, una actividad antiobesidad, una actividad de disminución del nivel de colesterol, una actividad de aumento del metabolismo basal, una actividad antialérgica y/o una actividad inmunoestimuladora, etc.).

Además, el microorganismo de la presente invención tiene actividad de reducción de grasa neutra hepática. Por tanto, usando el microorganismo de la presente invención, es posible disminuir el nivel de grasa neutra hepática (por ejemplo, la cantidad de grasa neutra acumulada en el hígado). El microorganismo de la presente invención es eficaz para la retención o mejora del metabolismo lipídico hepático, o la prevención o mejora de la esteatosis hepática, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) y/o la cirrosis hepática. Además, el microorganismo de la presente invención se espera que tenga un efecto de prevención de la progresión de estas enfermedades en cánceres de hígado, o un efecto de prevención del desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

El microorganismo de la presente invención tiene actividad promotora del metabolismo energético en un organismo. Por tanto, el uso del microorganismo de la presente invención es eficaz para el mantenimiento de la salud en humanos o animales, incluyendo la supresión de la ganancia de peso corporal, la supresión de la obesidad, la reducción de grasa corporal, la reducción de grasa visceral y/o la prevención del síndrome metabólico. Además, el microorganismo de la presente invención se espera que tenga un efecto sobre la mejora o retención de biomarcadores relevantes con respecto a las actividades fisiológicas anteriores.

Además, dado que el microorganismo de la presente invención pertenece a *Lactobacillus paracasei*, que se ha aplicado en el campo de la alimentación, se cree que el microorganismo de la presente invención es lo suficientemente seguro como aditivo para composiciones de alimento. Tal como resulta evidente de ese modo, el microorganismo de la presente invención es adecuado para los campos de alimentos y bebidas y/o fármacos para humanos u otros animales.

50 **Descripción de las realizaciones**

1. Microorganismo

55 1-1. Actividad promotora de producción de poliaminas

El microorganismo de la presente invención tiene actividad promotora de producción de poliaminas. Tal como se describió anteriormente, la "actividad promotora de producción de poliaminas" es una acción de promoción de la producción de poliaminas en organismos de humanos u otros animales.

60 La "poliamina" usada en la presente invención es generalmente un nombre de colección para los hidrocarburos alifáticos que tienen dos o más grupos amino primarios, que es una sustancia reconocida como poliamina. Los ejemplos de poliamina incluyen putrescina, espermidina y espermina. La actividad promotora de producción de poliaminas del microorganismo de la presente invención promueve la producción de al menos una clase o dos clases, más preferiblemente todas las clases, de poliamina. Las células, los tejidos y los órganos en los que se promueve la producción de poliaminas (es decir, la síntesis de poliaminas en el organismo) por el microorganismo de la presente invención no están particularmente limitados. Los ejemplos de los órganos incluyen cavidad bucal,

esófago, estómago, duodeno, ciego, intestino delgado e intestino grueso, que son órganos en los que el microorganismo administrado por vía oral tiene efecto de manera directa. El intestino delgado es particularmente preferible.

5 La actividad promotora de producción de poliaminas del microorganismo de la presente invención puede medirse usando una técnica de análisis conocida. Específicamente, la actividad promotora de producción de poliaminas del microorganismo de la presente invención puede medirse de la siguiente manera usando un animal modelo (por ejemplo, ratones). Más específicamente, los ratones se alimentan con el microorganismo de la presente invención durante un determinado periodo de tiempo, luego se aíslan sus tejidos viscerales y se miden las cantidades de poliamina en los tejidos. Además, las cantidades de poliamina medidas se comparan con las cantidades de poliamina en los tejidos viscerales aislados de ratones que no se han alimentado con el microorganismo de la presente invención, midiendo de ese modo un aumento relativo por el microorganismo de la presente invención. En esta medición, la muestra usada para la medición de la cantidad de poliamina no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferible medir y comparar las cantidades de poliamina en el tejido del intestino delgado y el contenido cecal. Por ejemplo, cuando la medición revela que la cantidad de poliamina en el intestino delgado aumentó mientras que la cantidad de poliamina en el contenido del ciego no aumentó, puede juzgarse que el microorganismo tiene una acción de promoción de la producción de poliaminas en un organismo.

20 Es preferible que la cantidad de poliamina en el organismo aumente en un factor de 1,1 a 1,5 mediante la administración del microorganismo de la presente invención a humanos u otros animales, en comparación con la antes de la administración. Esto es, por ejemplo, para recibir un efecto de reducción de un aumento de la grasa neutra hepática suprimiendo la acumulación excesiva de lípidos o promoviendo el metabolismo lipídico en el organismo.

25 1-2. Características micológicas

El microorganismo de la presente invención pertenece a *Lactobacillus paracasei*. La tabla 1 a continuación muestra las propiedades micológicas preferibles del microorganismo.

30 Tabla 1

Forma de la célula	Forma de bastón
Tinción de Gram	Positiva
Motilidad	Ninguna
Esporas	Ninguna
Temperatura de crecimiento	30-40°C
Crecimiento en condición anaerobia	Positivo
Crecimiento en condición aerobia	Positivo
Producción de gases	Ninguna

1-3. Características en cuanto a la formación de colonias

35 El microorganismo de la presente invención preferiblemente forma colonias que tienen las características a continuación cuando el microorganismo se cultiva en medio de agar que tiene la formulación a continuación (*Lactobacilli* MRS Agar n.º 288210) a 37°C durante 16 horas en condiciones anaerobias.

40 • Formulación del medio (pH 6,5 ± 0,2)

Proteosa-peptona n.º 3	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Polisorbato 80	1 g
Citrato de amonio	2 g
Acetato de sodio	5 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Fosfato de dipotasio	15 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

• Forma de la colonia

Diámetro: de 1 a 2 mm  
Color: blanco

Forma: circular  
 Estado de elevación: convexo  
 Margen: entero  
 Forma de superficie: lisa  
 Transparencia: translúcida  
 Viscosidad: butirosa

1-4. Características en cuanto a la asimilación de hidrocarburos

5 La asimilación de hidrocarburos del microorganismo de la presente invención es preferiblemente tal como se muestra en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Hidrocarburo	Presencia/ausencia de asimilación	Hidrocarburo	Presencia/ausencia de asimilación
Glicerol	-	Salicina	+
Eritritol	-	D-celobiosa	+
D-arabinosa	-	D-maltosa	+
L-arabinosa	-	D-lactosa	+
D-ribosa	+	D-melibiosa	-
D-xilosa	-	D-sacarosa	+
L-xilosa	-	D-trehalosa	+
D-adonitol	+	D-inulina	-
Metil-β-D-xilopiranosido	-	D-melezitosa	+
D-galactosa	+	D-rafinosa	-
D-glucosa	+	Almidón	-
D-fructosa	+	Glucógeno	-
D-manosa	+	Xilitol	-
L-sorbosa	+	Gentiobiosa	+
L-ramnosa	-	D-turanosa	+
Dulcitol	-	D-lixosa	+
Inositol	-	D-tagatosa	+
D-manitol	+	D-fucosa	-
D-sorbitol	+	L-fucosa	-
Metil α-D-manopiranosido	-	D-arabitol	-
Metil α-D-glucopiranosido	+	L-arabitol	-
N-acetilglucosamina	+	Gluconato	+
Amigdalina	+	2-cetogluconato	-
Arbutina	+	5-cetogluconato	-
Citrato férrico de esculina	+		

10 En la tabla, "+" significa positivo y "-" significa negativo.

1-5. Actividad de reducción de grasa neutra hepática

15 El microorganismo de la presente invención preferiblemente tiene una actividad de reducción de grasa neutra hepática cuando se ingiere por o se administra a humanos u otros animales. La grasa neutra no está particularmente limitada, pero generalmente es triglicérido. Dado que la actividad de reducción de la grasa neutra hepática del microorganismo de la presente invención hace posible reducir la cantidad de grasa neutra ya acumulada en el hígado, el microorganismo de la presente invención es útil para, por ejemplo, el tratamiento o la mejora de los humanos que tienen esteatosis hepática, así como la prevención de la progresión de esteatosis hepática en  
 20 humanos con riesgo de esteatosis hepática, o el mantenimiento de la salud. Además, el microorganismo de la presente invención también es útil para la prevención de la progresión a NASH, la cirrosis hepática, el cáncer de hígado y/o la cardiopatía debido a la acumulación de grasa neutra hepática.

25 La actividad de reducción de grasa neutra hepática del microorganismo de la presente invención puede medirse usando una técnica de análisis conocida. Específicamente, la actividad de reducción de grasa neutra hepática de la presente invención puede medirse usando un animal modelo (por ejemplo, ratones) según los procedimientos a continuación. Los ratones se alimentan con el microorganismo de la presente invención durante un determinado periodo de tiempo; después de eso, se aíslan sus hígados y se extraen las grasas neutras según el método de Folch *et al.* (J. Biol. Chem. 1957; 226 (1): 497-509). Las cantidades de las grasas neutras se miden usando un kit obtenido  
 30 de un proveedor comercial. Con los mismos procedimientos, se miden las cantidades de grasas neutras en los hígados aislados de ratones que no se han alimentado con el microorganismo de la presente invención. Luego, las

cantidades de grasa neutra en los ratones alimentados con el microorganismo de la presente invención se comparan con las cantidades de grasa neutra en los ratones no alimentados con el microorganismo de la presente invención, midiendo de ese modo la actividad de reducción de la grasa neutra hepática.

#### 5 1-6. Actividad promotora del metabolismo energético

El microorganismo de la presente invención preferiblemente tiene actividad promotora del metabolismo energético en un organismo cuando se ingiere por o se administra a humanos u otros animales. Más específicamente, el microorganismo de la presente invención tiene una acción de promoción del metabolismo energético en el tejido intestinal (en particular, en el tejido del intestino delgado) y/o el hígado. Usando el microorganismo de la presente invención, es posible mejorar las constituciones, o aliviar el síndrome metabólico y/o la obesidad o similares de humanos u otros animales que necesitan la promoción del metabolismo energético.

Tal como se muestra en los ejemplos, la actividad promotora del metabolismo energético del microorganismo de la presente invención puede confirmarse midiendo los cambios en las cantidades de expresión de ARNm que codifica para enzimas relacionadas con el metabolismo energético (Kondo *et al.*, Am. J. Physiol. Endocrinol Metab, 291, E1092-E1099, 2006). Además, la actividad promotora del metabolismo energético del microorganismo de la presente invención puede confirmarse mediante medición calorimétrica en humanos u otros animales antes y después de la ingesta del microorganismo de la presente invención (Sasaki, Measurement of resting energy expenditure and substrates expenditure using Indirect Calorimetry, 24, 5, 1021-1025; Kaiyala *et al.*, Biochemistry and Physiology, parte A 158, 252-264, 2011), mediciones de la cantidad de consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono (Klaus *et al.*, International Journal of Obesity, 29, 615-623, 2005) y/o mediciones de las actividades de enzimas relacionadas con el metabolismo.

#### 25 1-7. Otras actividades

Además de lo anterior, el microorganismo de la presente invención preferiblemente tiene también actividad de reducción del nivel de glucosa en sangre, actividad de reducción del nivel de grasa neutra en sangre, actividad de reducción del nivel de endotoxina en sangre, actividad de reducción selectiva de ácidos grasos saturados, actividad promotora de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el intestino delgado y el hígado y/o actividad promotora de la expresión de ARN TLR-2m en el intestino delgado, y similares. Por consiguiente, el microorganismo de la presente invención es útil para el tratamiento de pacientes con diabetes en función de su actividad de reducción del nivel de glucosa en sangre, y también es útil para el tratamiento de la septicemia en función de su actividad de reducción del nivel de endotoxina en sangre. Además, la actividad promotora de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el intestino delgado y el hígado conduce a la promoción del metabolismo energético mencionada anteriormente. Además, dado que la expresión de ARN TLR-2m en el intestino delgado aumenta la función de barrera de la mucosa del intestino delgado y, por tanto, produce actividad inmunoestimuladora (Cario *et al.*, Gastroenterology, 132, 4, 1359-1374, 2007), se esperan los efectos sobre la prevención o el tratamiento de enteropatía inflamatoria, infección bacteriana, infección viral, endotoxemia, cardiopatía, aterosclerosis, alergia alimentaria, dermatitis atópica y similares.

#### 40 1-8. Cepa representativa

El microorganismo representativo de la presente invención es la cepa WON0604. Esta cepa se depositó internacionalmente en el Depositario Internacional de Organismos de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566 Japón) el 20 de febrero de 2012, con el número de registro FERM BP-11468. La cepa WON0604 satisface todas las características 1-1 a 1-7 anteriores. El Depositario Internacional de Organismos de Patentes en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada se consolidó con el Depositario Internacional de Organismos de Patentes en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación de la Agencia Administrativa Incorporada (NITE) en abril de 2012, y se asumió su responsabilidad con respecto al Depositario de Organismos de Patentes por el Depositario Internacional de Organismos de Patentes en el Centro de Recursos Biológicos del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE-IPOD) (sala 120 2-5-8 Kazusa-Kamatari, Kisarazu-city, Chiba 292-0818 JAPÓN).

El microorganismo de la presente invención está preferiblemente en un estado aislado. Además, en lo que respecta a la actividad promotora de producción de poliaminas, la actividad de reducción de la grasa neutra hepática y la actividad promotora del metabolismo energético descritas anteriormente, el microorganismo de la presente invención puede ser células viables o células muertas, y puede estar en un estado de células purificadas, células más o menos purificadas, células mezcladas con medio no purificado o un extracto celular. El microorganismo de la presente invención es preferiblemente células viables porque las células viables muestran continua y eficazmente actividad promotora de producción de poliaminas en un organismo. Además, añadiendo un conservante liofilizado comúnmente usado a las células viables para liofilizar las células, y conservando las células liofilizadas resultantes en una nevera o en un congelador, es posible conservar las células viables durante un largo periodo de tiempo. En una realización, el microorganismo de la presente invención está en un estado liofilizado.

#### 65 1-9. Método de obtención del microorganismo de la presente invención

La fuente de la que va a aislarse el microorganismo de la presente invención no está particularmente limitada. Por ejemplo, el microorganismo de la presente invención puede aislarse de alimentos que se sabe que contienen *Lactobacillus paracasei* en los mismos (por ejemplo, diversos encurtidos japoneses, encurtidos coreanos, leche de vaca, queso y similares). Dado que la cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604, es decir, el microorganismo de la presente invención, se aisló usando sushi de carpa cruciana como fuente, el microorganismo de la presente invención puede aislarse, por ejemplo, usando sushi de carpa cruciana como fuente. El sushi de carpa cruciana designa un alimento producido por fermentación láctica de arroz y pescado producido alrededor del lago Biwa en Japón. El aislamiento de bacterias del ácido láctico del sushi de carpa cruciana puede realizarse, por ejemplo, según el método descrito en Tuda *et al.* (Food Sci. Technol. Res., 18 (1), 77-82, 2012).

El aislamiento del microorganismo de la presente invención puede realizarse mediante un método de detección conocido usando la actividad promotora de producción de poliaminas, la actividad de reducción de grasa neutra hepática y la actividad promotora de metabolismo energético descritas anteriormente como índices. Por ejemplo, el microorganismo de la presente invención puede aislarse (1) confirmando si el alimento o similar usado como fuente tiene actividad promotora de producción de poliaminas, (2) diluyendo la fuente que tenía su actividad promotora de producción de poliaminas confirmada con una disolución tampón apropiada, aplicando la fuente diluida a medio de agar para cultivar las células en colonias, (3) identificando una colonia o colonias que tiene(n) actividad promotora de producción de poliaminas entre las colonias formadas, (4) extrayendo ADN de 16Sr de la colonia, determinando de ese modo la secuencia de las mismas y, por tanto, juzgando si la fuente pertenece a *Lactobacillus paracasei*.

## 2. Composición

La composición de la presente invención es una composición a la que se le ha añadido el microorganismo de la presente invención. El tipo y la forma de la composición no están particularmente limitados en la medida en que la actividad promotora de producción de poliaminas y, preferiblemente, la actividad de reducción de grasa neutra hepática y la actividad promotora del metabolismo energético del microorganismo de la presente invención no se inhiban. Sin embargo, en vista de la exposición deseable de estas funciones en animales, en particular en organismos humanos, la composición es preferiblemente una composición de alimento o de bebida, o una composición farmacéutica.

Con la adición del microorganismo de la presente invención, la composición de la presente invención tiene actividad promotora de producción de poliaminas, actividad de reducción de grasa neutra hepática y/o actividad promotora del metabolismo energético. Por tanto, en una realización preferida, es posible usar la composición de la presente invención para un promotor de producción de poliaminas, un reductor de grasa neutra hepática y/o un promotor del metabolismo energético. Aunque el promotor de producción de poliaminas anterior y similares puede estar en forma de una composición, también puede consistir sólo en el microorganismo de la presente invención.

La composición de la presente invención puede contener otros componentes arbitrarios según su forma y propósito, en la medida en que no se interfieran la actividad promotora de producción de poliaminas y similares del microorganismo de la presente invención. Por ejemplo, en vista de mantener el crecimiento del microorganismo de la presente invención, la composición de la presente invención contiene preferiblemente, por ejemplo, composiciones nutritivas adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la presente invención, tales como leche desnatada, dextrina, y similares.

La cantidad del microorganismo de la presente invención que va a añadirse a la composición de la presente invención no está particularmente limitada, y puede establecerse adecuadamente en la medida en que se muestre la actividad promotora de producción de poliaminas y similares del microorganismo en animales, en particular, en organismos humanos. Por ejemplo, sobre una base celular viable, la composición de la presente invención puede contener el microorganismo en una cantidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^{16}$  UFC por gramo de la composición, preferiblemente de  $1,0 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^{14}$  UFC por gramo de la composición, más preferiblemente de  $1,0 \times 10^8$  a  $1,0 \times 10^{12}$  UFC por gramo de la composición.

El tipo o la forma de la composición de alimento o de bebida a la que se le añade el microorganismo de la presente invención no están particularmente limitados, y los ejemplos incluyen, además de alimentos y bebidas en general, diversos alimentos funcionales (por ejemplo, alimento para su uso específico en salud, complemento dietético, complemento, alimento para pacientes y alimento saludable). Al añadir el microorganismo de la presente invención a tales alimentos, es posible mejorar adicionalmente la actividad promotora de producción de poliaminas y similares, y proporcionar de ese modo una composición de alimento o de bebida mejorada que promueva más eficazmente la producción de poliaminas en un organismo. Una composición de alimento o de bebida mejorada de este tipo también puede usarse para el control homeostático en un organismo.

Cuando la composición de la presente invención es una composición de alimento o de bebida, la forma de la composición no está particularmente limitada en la medida en que no se inhiban la actividad promotora de producción de poliaminas y similares del microorganismo de la presente invención. Los ejemplos de composición de alimento incluyen gránulos, gránulos finos, polvo, cápsulas, comprimidos, goma, gelatina, caramelo gomoso, barras, patatas fritas, copos y otros alimentos generales. Los ejemplos de alimentos generales incluyen chocolates, pastas,

dulces, galletas, confites en comprimidos, helado, sorbete, fideos *Udon* (trigo), fideos *soba* (trigo sarraceno), pasta y fideos *somen* (trigo fino). Los ejemplos de composiciones de bebida incluyen diversas bebidas tales como bebidas en polvo, refrescos, bebidas lácteas, bebidas nutricionales, bebidas carbonatadas y bebidas de gelatina. Los ejemplos de las formas de alimentos funcionales incluyen polvo, gránulos, cápsulas, jarabe, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar y comprimidos sublinguales.

Los medios para añadir el microorganismo de la presente invención a una composición de alimento o de bebida no están particularmente limitados. Por ejemplo, el microorganismo de la presente invención puede añadirse a una composición de alimento o de bebida durante la elaboración, el procesado o en una etapa final de la composición de alimento o de bebida, mediante adición, mezcla, infiltración o similares. Además, el microorganismo de la presente invención puede añadirse en forma de polvo, gránulos, cápsulas, jarabe, comprimidos o similares tras la ingesta de alimentos y bebidas.

Cuando la composición de la presente invención es una composición farmacéutica, es posible producir diversas formas de fármaco mezclando el microorganismo de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable no está particularmente limitado en la medida en que no se inhiba la actividad promotora de producción de poliaminas y similares del microorganismo de la presente invención. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diversas cargas, expansores, aglutinantes, humectantes, disgregantes, agentes tensioactivos, lubricantes y diluyentes, que generalmente se usan en el campo médico. La forma de la composición farmacéutica en la que se añade el microorganismo de la presente invención no está particularmente limitada. Los ejemplos de la forma incluyen comprimidos, pastillas, fármacos en polvo, líquidos, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas. La forma del fármaco es preferiblemente una forma adecuada para administración oral.

Al contener el microorganismo de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención muestra actividad promotora de producción de poliaminas así como, preferiblemente, actividad de reducción de grasa neutra hepática y actividad promotora del metabolismo energético. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para promover la producción de poliaminas en un organismo, una composición farmacéutica para reducir la grasa neutra hepática y/o una composición farmacéutica para promover el metabolismo energético. Además, basándose en la actividad de reducción de grasa neutra hepática del microorganismo de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de esteatosis hepática, una composición farmacéutica para la prevención de la progresión o el tratamiento de NASH, cirrosis hepática y/o cáncer de hígado. Además, basándose en la actividad promotora del metabolismo energético del microorganismo de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento del síndrome metabólico.

La cantidad del microorganismo de la presente invención que va a añadirse a la composición farmacéutica de la presente invención es similar a la cantidad definida anteriormente para las composiciones generales. La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede establecerse adecuadamente según el síntoma, la edad, el peso y similares del humano o el animal que ingiere la composición.

La forma de dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada, en la medida en que se muestre la actividad promotora de producción de poliaminas y similares del microorganismo de la presente invención en el cuerpo. Sin embargo, la forma de dosificación es preferiblemente administración oral.

### 3. Método de tratamiento y mejora

El microorganismo de la presente invención tiene actividad promotora de producción de poliaminas en un organismo de animales, en particular, humanos. Se sabe que la poliamina tiene un efecto antienvjecimiento, una actividad de retardo de la progresión de arterioesclerosis, una actividad supresora de inflamación aguda y crónica, una actividad de reducción de grasa neutra, una actividad de mejora de resistencia a la insulina, una actividad antiobesidad, una actividad de disminución del nivel de colesterol, una actividad de aumento del metabolismo basal, una actividad antialérgica, una actividad inmunoestimuladora, y similares. Por tanto, puede proporcionarse un método para prevenir, tratar o mejorar diversas enfermedades usando estas actividades, que comprende administrar el microorganismo de la presente invención. Además, en una realización preferida, el microorganismo de la presente invención tiene actividad de reducción de grasa neutra hepática. Por tanto, administrando el microorganismo de la presente invención a un humano o un animal que necesita una reducción de grasa neutra hepática, es posible reducir la grasa neutra hepática. Además, en una realización preferida, la presente invención tiene actividad promotora del metabolismo energético en un organismo. Por tanto, administrando el microorganismo de la presente invención a un humano o un animal que necesita promover el metabolismo energético, es posible suprimir el aumento de peso corporal, suprimir la obesidad, reducir la grasa corporal, reducir la grasa visceral y prevenir, mejorar o tratar el síndrome metabólico.

La dosis del microorganismo de la presente invención, o la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención en la que se añade el microorganismo de la presente invención para llevar a cabo el método anterior,

puede establecerse adecuadamente según el síntoma o similar del paciente. Por ejemplo, la dosis es de  $1,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^{15}$  UFC/kg/día.

## Ejemplos

5

### Ejemplo 1

Aislamiento del microorganismo

10 Se colocaron de 0,8 a 1,0 g de sushi de carpa cruciana homogeneizado en un tubo de centrifuga de 15 ml, y se añadió diez veces la cantidad de solución salina fisiológica y se agitó. Se retiró 1 ml de la suspensión agitada y se colocó en un tubo de centrifuga de 15 ml junto con 9 ml de una solución salina fisiológica, seguido por dilución gradual. Se obtuvieron 100  $\mu$ l de cada diluyente, se inocularon en medio de agar MRS y se cultivaron durante 15 24 horas a 37°C en condiciones anaerobias. Después del cultivo, se purificaron las células hasta convertirse en una sola colonia. Estas operaciones se realizaron como manipulación aséptica.

La cepa WON0604 aislada se depositó en el Depositario Internacional de Organismos de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (1-1-1 Higashi, Tsukuba-city, Ibaraki 305-8566 Japón), con el número de registro FERM BP-11468.

20

### Ejemplo 2

Actividad promotora de producción de poliaminas

25 Se privaron de nutrientes ratones KK-Ay (modelo de diabetes tipo II, macho) a las 4 semanas de edad durante 16 horas, y se extrajo sangre de un único vaso capilar en la vena de la cola (aproximadamente 75  $\mu$ l). Se preparó plasma por centrifugación (12.000 rpm (15.000  $\times$  g)  $\times$  5 minutos), y se midieron la concentración de glucosa en sangre y la concentración de grasa neutra en sangre. Los ratones sin condiciones de salud anómalas se clasificaron en un grupo de control y un grupo de prueba, mientras se eliminaba el sesgo en el peso corporal (el día anterior al agrupamiento) y la concentración de glucosa en sangre mediante muestreo aleatorio estratificado usando el software SAS (R9.1, SAS Institute Japan). Durante 28 días, el grupo de control se alimentó libremente con una comida de control (AIN-93G), y el grupo de prueba se alimentó libremente con una comida de prueba mezclada con la cepa WON0604 en una proporción de  $1,0 \times 10^9$  UFC/día (células viables). Después de eso, se diseccionaron el ciego y el tejido del intestino delgado, y se midieron las concentraciones de poliamina en el contenido cecal y el tejido del 35 intestino delgado. La tabla 3 muestra los valores de cada grupo de prueba en relación con la concentración de poliamina del grupo de control, que se supone como 1. n = 3 tanto para el contenido cecal como para el tejido del intestino delgado. La concentración de poliamina en el contenido cecal se midió mediante un método de derivatización en columna usando O-ftalaldehído. La concentración de poliamina en el tejido del intestino delgado se midió usando un sistema CE-TOFMS (Agilent Technologies). La prueba de significación estadística se realizó según 40 la prueba de la t de Welch.

Tabla 3

Cantidad de poliamina en el intestino delgado

45

	Valor relativo frente al control	Valor de P
Putrescina	1,4	0,007*
Espermidina	1,3	0,064
Espermina	1,1	0,523

\*P<0,01

Tabla 4

50

Cantidad de poliamina en el ciego

	Valor relativo frente al control	Valor de P
Putrescina	0,79	0,412
Espermidina	1,07	0,549
Espermina	0,93	0,549

55 Tal como se muestra en la tabla 4, la concentración de poliamina en el ciego no aumentó por la ingesta de la cepa WON0604. Por el contrario, tal como se muestra en la tabla 3, la putrescina aumentó significativamente en el intestino delgado, y también hubo una tendencia de aumento de la espermidina y la espermina en el intestino delgado. Los resultados revelaron que la ingesta de la cepa WON0604 aumentó la poliamina en el intestino delgado.

Esto aclaró que el microorganismo de la presente invención tiene una acción de promoción de la capacidad de síntesis de poliaminas en el intestino delgado (es decir, actividad promotora de síntesis de poliaminas).

### Ejemplo 3

#### Actividad promotora del metabolismo energético

De manera similar al ejemplo 2, los ratones KK-Ay (modelo de diabetes tipo II, macho) a las 4 semanas de edad se clasificaron en un grupo de control y un grupo de prueba; el grupo de control se alimentó libremente con una comida de control (AIN-93G) y el grupo de prueba se alimentó libremente con una comida de prueba mezclada con la cepa WON0604 en una proporción de  $1,0 \times 10^9$  UFC/día (células viables) durante 28 días. Después de eso, se midieron los niveles de expresión de ARNm de diversas enzimas relacionadas con el metabolismo energético en el hígado y el intestino delgado. La extracción y purificación de ARNm se realizaron usando un kit RiboPure® (Ambion). La tabla 5 muestra los resultados, es decir, los valores de los grupos de comida de prueba en relación con el valor del grupo de control, que se supone como 1. En esta prueba,  $n = 13$ , y los valores relativos se calcularon usando valores promedio.

Tabla 5

	Nivel de expresión de ARNm relativo en el intestino delgado	Valor de P
Acox1	1,16	0,020*
Ucp2	1,33	0,048*
Acot2	1,29	0,058

\* $P < 0,05$

Tabla 6

	Nivel de expresión de ARNm relativo en el intestino delgado	Valor de P
Acox1	1,31	0,001*
Ucp2	1,17	0,067
Acot2	1,21	0,066

\* $P < 0,05$

Los resultados mostrados en las tablas 5 y 6 confirmaron que la ingesta del microorganismo de la presente invención aumentó las cantidades de expresión de ARNm de Acox1, Ucp2 y Acot2 en el hígado y el intestino delgado. La relevancia de la expresión de estos genes y la promoción del metabolismo energético se han notificado por Kondo *et al.* (Kondo H, *et al.*, Am J Physiol. Endocrinol Metab 2006; 291 (5): E1092-9) Los resultados confirmaron que, además del efecto promotor de producción de poliaminas, también se confirmó la posibilidad de promover el metabolismo energético en el hígado y el intestino delgado mediante la ingesta del microorganismo de la presente invención.

### Ejemplo 4

#### Actividad de reducción de grasa neutra hepática

De manera similar al ejemplo 2, los ratones KK-Ay (modelo de diabetes tipo II, macho) a las 4 semanas de edad se clasificaron en un grupo de control y un grupo de prueba; el grupo de control se alimentó libremente con una comida de control (AIN-93G) durante 28 días y cada grupo de prueba se alimentó libremente con una comida de prueba mezclada con el 3% de una comida de prueba que contenía la cepa WON0604, la cepa WON1052, la cepa WON1081 o la cepa WON1033 en una proporción de  $1,0 \times 10^9$  UFC/día (células viables) durante 28 días. Estas cepas bacterianas del ácido láctico distintas de la cepa WON0604 se obtuvieron seleccionando cepas resistentes al ácido gástrico y al ácido biliar a través de una prueba *in vitro*, y luego seleccionando cepas con posibles eficacias con respecto a la grasa neutra en sangre y la grasa neutra hepática a través de una prueba exploratoria en animales usando ratones KK-Ay. Después de eso, se extrajo el hígado de cada ratón en ayunas. Se pesó la región exterior del *lobus hepatis sinister* (lóbulo izquierdo del hígado) y se extrajo la fracción lipídica usando el método de Folch *et al.* (Folch J. *et al.*, J. Biol. Chem 1957; 226 (1): 497-509) y se solubilizó con isopropanol; después de eso, se midió la concentración de grasa neutra usando un kit de medición obtenido de un proveedor comercial (Triglyceride E-test Wako; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La tabla 7 muestra los valores promedio de los resultados de la medición. Cada grupo de prueba tenía ocho ratones. La prueba de significación estadística se realizó según la prueba de la t.

5 Tal como se muestra en la tabla 7, la concentración de TG hepática disminuyó sólo en los ratones alimentados con la cepa WON0604, en comparación con el grupo control con diferencia significativa; y la actividad de reducción de la concentración de TG hepática no se observó en los grupos de prueba comparativos alimentados con bacterias del ácido láctico distintas de la cepa WON0604. Los resultados confirmaron de ese modo la posibilidad de actividad de reducción de grasa neutra hepática por el microorganismo de la presente invención, además del efecto promotor de producción de poliaminas.

Tabla 7

	TG hepática (mg/g de hígado)
Grupo de control	29,5±8,5
WON0604	18,4±6,8*
WON1052	26,4±6,3
WON1081	34,6±9,0
WON1033	25,3±9,7

10

\*P&lt;0,05

Número de registro

15

FERM BP-11468

**REIVINDICACIONES**

1. Cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 depositada como FERM BP-11468.
- 5 2. Composición a la que se le ha añadido la cepa de *Lactobacillus paracasei* WON0604 depositada como FERM BP-11468 según la reivindicación 1.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que la composición es una composición de alimento o de bebida.
- 10 4. Composición según la reivindicación 2, en la que la composición es una composición farmacéutica.