



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 602**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03741533 .8**

96 Fecha de presentación : **22.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1541672**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Composición para fomentar la proliferación de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*.**

30 Prioridad: **22.07.2002 JP 2002-212336**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2009

73 Titular/es: **MEITO SANGYO Co., Ltd.**
41, Sasatsuka-cho 2-chome
Nishi-ku, Nagoya-shi, Aichi-ken 451-8520, JP

72 Inventor/es: **Yasuda, Kenji;**
Ogawa, Tomohiko y
Hasegawa, Masakatsu

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 321 602 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 para fomentar la proliferación de *Lactobacillus casei* subsp. *casei*.

5 Campo técnico

La presente invención divulga: una composición que comprende dextrano para fomentar la proliferación bacteriana para selectivamente hacer proliferar *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (de aquí en adelante, abreviado como “*L. casei* subsp. *casei*”) que es una de las especies de bacterias del ácido láctico que tienen una variedad de actividades biológicas; y la composición para fomentar la proliferación bacteriana, que comprende además *L. casei* subsp. *casei*.
10 Más específicamente, la presente invención divulga: una composición farmacéutica para aumentar actividades biológicas, que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana; y un alimento natural y un pienso para aumentar actividades biológicas, que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana.

15 Antecedentes técnicos

Recientemente, la ingestión de “formulaciones de microorganismos” a los que se denomina probióticos y que consisten en microorganismos útiles tal como bacterias del ácido láctico vivas con el fin de llevar a cabo un control de la función intestinal, prevención de enfermedades infecciosas, inmunoestimulación, o similares ha atraído atención.
20 Sin embargo, existe una duda de si los microorganismos útiles pueden crecer en y colonizar el intestino de un ser humano, animal, o similar. Si los microorganismos útiles no pueden crecer en y colonizar el intestino, no se pueden obtener las actividades biológicas esperadas de los microorganismos útiles de forma permanente. Para resolver tal problema, el hecho es que se propone y se lleva a cabo el suministro de la formulación de microorganismo de forma continua. Por otra parte, a los oligosacáridos o similares que pueden ser utilizados por los microorganismos útiles en los probióticos se les denomina prebióticos, y los preparados que combinan prebióticos y probióticos se denominan simbióticos. Esos también se administran a un ser humano, animal, o similar para los fines anteriormente mencionados.
25 Sin embargo, cuando los prebióticos son utilizados por muchas bacterias entéricas diferentes de las bacterias deseadas, esas bacterias luchan por los prebióticos en el intestino, de modo que es difícil que los microorganismos útiles deseados crezcan y colonicen de forma selectiva.
30

Divulgación de la invención

35 Es deseable que, tras la ingestión de microorganismos útiles denominados probióticos para el ser humano, animal, o similar, se sostengan una variedad de actividades biológicas originadas en los microorganismos útiles en un ser vivo haciendo crecer-proliferar y colonizar de forma selectiva los microorganismos útiles en el intestino o haciendo crecer-proliferar de forma selectiva los microorganismos endógenos útiles en el intestino sin suministrar esos microorganismos útiles continuamente.
40

Los inventores de la presente invención han encontrado mediante un ensayo *in vivo* que, entre muchos microorganismos útiles, *L. casei* subsp. *casei* es una especie de bacteria capaz de crecer-proliferar utilizando un dextrano. *L. casei* subsp. *casei* se clasifica y nombra en Approved Lists (1980). La bacteria es Gram positiva, endógena del intestino de un ser humano, animal, o similar, y un bacilo anaerobio facultativo. La bacteria forma la flora bacteriana intestinal junto con otras bacterias.
45

De esta manera, al principio, se confirmó si la bacteria misma tenía actividades biológicas o no, por ejemplo, un efecto inmunoestimulador en el caso de inmunización subcutánea. Como resultado, se ha encontrado que la bacteria aumenta y mantiene la inmunidad humoral y la inmunidad celular. A continuación, se ha administrado *L. casei* subsp. *casei* a un ratón sólo en la administración inicial, y después se ingirió un dextrano por vía oral permanentemente, para confirmar si *L. casei* subsp. *casei* puede crecer-proliferar y colonizar de forma selectiva el intestino de un ser humano, animal, o similar, y si las actividades biológicas de la bacteria se pueden sostener o no mediante la ingestión oral de un dextrano. Como resultado, los inventores de la presente invención han encontrado mediante una prueba *in vivo* que la bacteria crece-prolifera y coloniza el intestino utilizando el dextrano, y las actividades biológicas de la bacteria tales como inmunidad humoral e inmunidad celular aumentan y se mantienen.
50
55

Por otra parte, también se sabe que un dextrano por sí mismo tiene una variedad de actividades biológicas, y se ha confirmado que, en el caso de la administración de un dextrano junto con *L. casei* subsp. *casei*, se mantiene un efecto mayor que en el caso de la administración de sólo un dextrano, y el efecto sinérgico es grande.
60

La presente invención se ha realizado como se ha descrito anteriormente. Lo esencial de la presente invención es como sigue.

(1) Una composición para fomentar la proliferación bacteriana para selectivamente hacer proliferar *L. casei* subsp. *casei*, que comprende un dextrano, que además comprende *L. casei* subsp. *casei*.
65

(2) La composición para fomentar la proliferación bacteriana según (1), en donde el dextrano tiene un peso molecular de 2.000 a 40.000.000.

ES 2 321 602 T3

(3) Una composición farmacéutica que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana según (1) ó (2).

(4) Un alimento natural que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana según (1) ó (2).

(5) Un pienso que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana según (1) ó (2).

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un dibujo que muestra un efecto de un dextrano sobre el número de bacterias de *L. casei* subsp. *casei* en heces de ratón.

La figura 2 es un dibujo que muestra los resultados del aumento de la inmunidad humoral por un dextrano en el caso de la administración de un antígeno por vía oral.

La figura 3 es un dibujo que muestra los resultados del aumento de la inmunidad celular por un dextrano en el caso de la administración de un antígeno por vía oral.

La figura 4 es un dibujo que muestra los resultados del aumento de la inmunidad humoral por un dextrano en el caso de la administración de un antígeno por vía subcutánea.

La figura 5 es un dibujo que muestra los resultados del aumento de la inmunidad celular por un dextrano en el caso de la administración de un antígeno por vía subcutánea.

Mejor manera de llevar a cabo la invención

La invención divulga una composición que comprende dextrano para fomentar la proliferación bacteriana para selectivamente hacer proliferar *L. casei* subsp. *casei* y la composición para fomentar la proliferación bacteriana, que además comprende *L. casei* subsp. *casei*. Los dextranos a ser usados en la composición de la presente invención se pueden sintetizar, preparar, o similar según un método general que es bien conocido para el experto en la materia. Además, el cultivo de *L. casei* subsp. *casei*, métodos para preparar y secar las células bacterianas, recombinación génica, y similares se pueden realizar según un método general que es bien conocido para el experto en la materia.

Descripción del dextrano que se va a usar en la presente invención

Un dextrano es un polisacárido que consiste en glucosa, que están unidas principalmente con un enlace α -1,6. Los dextranos que se van a usar en la presente invención pueden ser dextranos comercialmente disponibles o dextranos obtenidos cultivando bacterias seleccionadas del grupo que consiste en el género *Leuconostoc* y el género *Streptococcus*, por ejemplo, *Leuconostoc mesenteroides*, en condiciones generales, por ejemplo, en un medio enriquecido que contiene sacarosa.

Peso molecular del dextrano que se va usar en la presente invención

Cada uno de los pesos moleculares de los dextranos que se van a usar en la presente invención es de 2.000 a 40.000.000, preferiblemente de 4.000 a 5.000.000, más preferiblemente de 4.000 a 2.000.000. Nótese que un dextrano que tiene un peso molecular de menos de 2.000 no es preferible porque pueden proliferar bacterias diferentes de *L. casei* subsp. *casei*. Los ejemplos de dextranos que se van a usar en la presente invención incluyen un dextrano obtenido cultivando las bacterias anteriormente mencionadas sin ningún tratamiento, y un dextrano que tiene un peso molecular apropiado obtenido mediante tratamiento adicional de hidrólisis parcial del tal dextrano.

L. casei subsp. casei que se va a usar en la presente invención

En la presente invención, se puede usar *L. casei* subsp. *casei* en forma de células viables, células secas capaces de crecer-proliferar, o similares. Como *L. casei* subsp. *casei* que se va usar en la presente invención, se puede usar un recombinante de *L. casei* subsp. *casei* que tiene al menos una capacidad de utilizar un dextrano en la composición para fomentar la proliferación bacteriana de la presente invención, además de uno salvaje. También se puede usar un recombinante obtenido transduciendo un gen que participa en una capacidad de utilizar dextrano originada en *L. casei* subsp. *casei* a otra bacteria. Preferiblemente, el recombinante es una nueva bacteria en la que se expresa una nueva actividad biológica mediante recombinación génica de *L. casei* subsp. *casei* u otra bacteria nueva obtenida mediante transducción de un gen que participa en una capacidad de utilizar dextrano originaria de *L. casei* subsp. *casei* a otra bacteria.

ES 2 321 602 T3

La composición de la presente invención es una composición que comprende dextrano para fomentar la proliferación bacteriana para selectivamente hacer proliferar *L. casei* subsp. *casei* que además comprende *L. casei* subsp. *casei*. La composición de la presente invención se puede preparar, administrar, o similar según un método general que es bien conocido para el experto en la materia excepto que la composición comprende un dextrano o además comprende *L. casei* subsp. *casei*.

Forma farmacéutica de la composición de la presente invención

La composición de la presente invención es una mezcla de un dextrano y *L. casei* subsp. *casei*. Preferiblemente, la composición de la presente invención se puede proporcionar como una composición en forma de sólido, semi-sólido o líquido que contiene un dextrano en combinación con un diluyente, soporte, o similar que es farmacéuticamente bien conocido y farmacéuticamente aceptable, o una composición en forma de sólido, semi-sólido o líquido que contiene un dextrano y *L. casei* subsp. *casei*. Nótese que la composición de la presente invención incluye: una forma en la que el dextrano de la presente invención y *L. casei* subsp. *casei* ya se han combinado. La cantidad de diluyente, soporte, o similar en la composición de la presente invención varía de forma apropiada según un propósito o uso, y no está particularmente limitada. En general, la cantidad es, por ejemplo, de alrededor del 0,1 hasta alrededor del 99,9% en peso, preferiblemente de alrededor del 1 hasta alrededor del 99% en peso, más preferiblemente de alrededor del 5% hasta alrededor del 95% en peso basado en el peso de la composición.

Nótese que, cuando están simultáneamente presentes un dextrano y *L. casei* subsp. *casei* en forma líquida, el contenido en dextrano se reduce gradualmente debido a la utilización bacteriana del dextrano, de modo que preferiblemente se evita la presencia simultánea de los mismos durante un tiempo largo. Así, es deseable que se procesen y empaqueten de forma separada, y los productos resultantes se mezclan cuando se ingieren, o que se ingieran de forma separada.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser la composición de la presente invención en sí misma sin otros componentes. Sin embargo, preferiblemente, la composición puede ser una preparada en combinación con un diluyente, soporte, o similar, que es farmacéuticamente bien conocido y farmacéuticamente aceptable, en una forma farmacéutica tal como una cápsula blanda, cápsula dura, gránulo, píldora, polvo, comprimido, jarabe, pastilla, o elixir. El experto en la materia conoce bien un método para preparar la composición en tal forma farmacéutica. Cuando la composición se prepara en tal forma farmacéutica, puede contener además un diluyente, soporte, o similar que sea adecuado para cada forma farmacéutica, farmacéuticamente bien conocido y farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar como un fármaco cuyo fin es sostener una variedad de actividades biológicas originadas en *L. casei* subsp. *casei* en un ser vivo mediante: selectivamente hacer crecer-proliferar y colonizar *L. casei* subsp. *casei* en el intestino de un ser humano, animal, o similar; o crecimiento-proliferación selectiva de *L. casei* subsp. *casei* en el intestino, que es endógena al intestino.

Cuando se prepara la composición farmacéutica de la presente invención, se puede determinar apropiadamente la cantidad de adición de la composición de la presente invención en referencia a la descripción que se refiere a la dosis y ciclo de dosificación de la presente invención descrita más adelante.

El alimento natural de la presente invención es uno que contiene la composición de la presente invención y una composición tal como un alimento sólido o líquido. Nótese que el alimento natural de la presente invención incluye: una forma en que la composición de la presente invención y una composición tal como un alimento sólido o líquido ya se han combinado; y una forma en la que la composición de la presente invención y una composición tal como un alimento sólido o líquido se han procesado de forma separada y se combinan cuando la composición se ingiere. Los ejemplos de tal alimento sólido o líquido incluyen: golosinas tales como caramelo, chocolate, y galleta; panes; fideos; bebidas en forma de polvo, líquido y similares; productos lácteos tal como yogur. En particular, en el caso de yogur, se puede producir el yogur usando tal *L. casei* subsp. *casei*, y es deseable que se mezcle un dextrano cuando se ingieren o que se ingieran por separado.

El pienso de la presente invención contiene la composición de la presente invención y pienso formulado para ganado, aves, peces, mascotas, o similares. Nótese que el pienso de la presente invención incluye: una forma en que la composición de la presente invención y una composición de pienso ya se han combinado; y una forma en la que la composición de la presente invención y una composición de pienso se han procesado de forma separada y se combinan cuando la composición se ingiere.

El alimento natural o el pienso de la presente invención se pueden usar para sostener una variedad de actividades biológicas originarias de *L. casei* subsp. *casei* en un ser vivo mediante: crecimiento-proliferación y colonización selectivas de *L. casei* subsp. *casei* en el intestino de un ser humano, animal, o similar; o crecimiento-proliferación selectiva de *L. casei* subsp. *casei* en el intestino, que es endógena al intestino.

Cuando se prepara el alimento natural o el pienso de la presente invención, se puede determinar apropiadamente la cantidad de adición de la composición de la presente invención con referencia a la descripción que se refiere a la dosis y ciclo de dosificación de la presente invención descrita a continuación.

ES 2 321 602 T3

Dosis y ciclo de dosificación de la composición de la presente invención

La dosis de la composición de la presente invención es, en términos de dosis de un dextrano en la composición, de 0,01 mg a 2 g/kg de peso-día, preferiblemente de 0,1 mg a 1 g/kg peso-día, más preferiblemente de 1 mg a 100 mg/kg de peso-día, y es preferible que al menos se administre de forma general una composición que comprende el dextrano de la presente invención a diario. Nótese que *L. casei* subsp. *casei* es originalmente una bacteria que es endógena al intestino de un ser humano, animal, o similar, y para inducir los efectos fiables de las actividades biológicas de *L. casei* subsp. *casei*, se administran al menos una vez células viables o células secas capaces de crecer-proliferar, preferiblemente en un intervalo apropiado. Además, para inducir efectos más fiables, esas células se pueden administrar a diario.

Diana aplicable de la composición de la presente invención

La composición de la presente invención se puede dirigir a todos los seres vivos tal como mamíferos incluyendo un ser humano, aves, reptiles, peces, crustáceos, e insectos.

Actividad biológica que se espera se va a impartir y/o mejorar mediante la composición de la presente invención

Se esperan los siguientes efectos: además de un efecto inmunoestimulador, las actividades biológicas generalmente mencionadas de las bacterias del ácido láctico tales como antitumoral, antihipertensión, antioxidación, antiúlceras, anti-VIH, mejora del metabolismo lipídico, supresión de tumores malignos recurrentes, antiinflamación, prevención y supresión de enfermedad autoinmune, disminución del colesterol en suero, disminución de la glucosa en sangre, supresión de la producción de anticuerpo IgE, antialergia, fomento de la producción de interleuquina 12, fomento de la absorción de minerales, enriquecimiento de minerales, regulación de la absorción y metabolismo de alcohol, prevención y tratamiento de infección de las vías urinarias, supresión de la producción de sustancias nocivas, control de la función intestinal, prevención de estreñimiento, belleza, tratamiento y prevención de hiperamonemia y encefalopatía hepática, o similares, prevención de infección, supresión del mal olor de las heces, descenso del pH intestinal de ganado, aves, mejora del crecimiento, fomento del engorde y ayuda en la puesta de huevos.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describe en más detalle por medio de ejemplos, pero la presente invención no está limitada a ellos.

Ejemplo 1

Método de preparación de dextrano usando sacarosa como material principal

Se inoculó *Leuconostoc mesenteroides*, que es una de las especies de bacterias del ácido láctico, en un medio que contenía sacarosa como material principal (medio enriquecido que contiene sacarosa), y se cultivaron de forma anaerobia a 25°C durante 24 horas. Posteriormente, se añadió metanol al sobrenadante del cultivo, y los precipitados resultantes se disolvieron en agua destilada. Después de haber retirado los insolubles, se añadió de nuevo metanol, y los precipitados resultantes se redisolviéron en agua destilada. La mezcla se sometió a secado por rociado, para producir de esta manera un dextrano. El dextrano además se hidrolizó parcialmente, y los productos resultantes se sometieron a fraccionamiento con metanol y secado por rociado, para producir de esta manera dextranos que tenían una variedad de pesos moleculares.

Ejemplo 2

Prueba de la capacidad de utilizar dextrano de las bacterias entéricas

Se inocularon una variedad de bacterias entéricas relacionadas en un medio PYF (medio de cultivo con peptona, extracto de levadura y solución de Fildes) al que se añadió un dextrano con un peso molecular (número medio) de 10.000 (en los siguientes ejemplos, se usó un dextrano que tenía tal peso molecular a menos que se defina de otra manera) al 0,5%, y se determinó la capacidad de utilización de dextrano. Como resultado, se confirmó que dos cepas de *L. casei* subsp. *casei* (JCM 1134 y JCM 8129) tenían capacidad de utilización de dextrano. Sin embargo, no se observó capacidad de utilización de dextrano para otras bacterias del ácido láctico como bacterias del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, y otras bacterias entéricas relacionadas. (Ver la tabla 1).

ES 2 321 602 T3

TABLA 1-1

Capacidad de utilización de dextrano de bacterias entéricas relacionadas

	Nombre bacteriano		Nombre de la cepa bacteriana	Capacidad de utilizar dextrano
5				
10	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i> subsp. <i>casei</i>	JCM 1134	+
		<i>casei</i> subsp. <i>casei</i>	JCM 8129	+
		<i>acidophilus</i>	#527	-
15		<i>acidophilus</i>	JCM 1132	-
		<i>agilis</i>	JCM 1187	-
		<i>amylovorus</i>	JCM 1126	-
		<i>aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i>	JCM 5666	-
20		<i>brevis</i>	JCM 1059	-
		<i>buchneri</i>	JCM 1115	-
		<i>casei</i> subsp. <i>alactosus</i>	JCM 1133	-
		<i>casei</i> subsp. <i>fusiformis</i>	JCM 1177	-
25		<i>casei</i> subsp. <i>plantarum</i>	JCM 8136	-
		<i>casei</i> subsp. <i>pseudoplarum</i>	JCM 1161	-
		<i>casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	JCM 1136	-
		<i>crispatus</i>	JCM 1185	-
30		<i>curvatus</i>	JCM 1096	-
		<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	JCM 1002	-
35		<i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 1248	-
		<i>fermentum</i>	JCM 1173	-
		<i>gallinarum</i>	JCM 2011	-
		<i>gasseri</i>	JCM 1131	-
40		<i>johnsonii</i>	JCM 2012	-
		<i>oris</i>	JCM 11028	-
		<i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	JCM 1053	-
		<i>plantarum</i>	IFO 3070	-
45		<i>reuteri</i>	JCM 1112	-
		<i>salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i>	JCM 1150	-
		<i>salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	JCM 1231	-
50	<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	JCM 1391	-
		<i>perfringens</i>	JCM 1290	-
	<i>Klasiella</i>	<i>pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	JCM 1662	-
	<i>Fusobacterium</i>	<i>varium</i>	JCM 3722	-
55	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	JCM 5803	-
		<i>faecium</i>	JCM 5804	-
	<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	JCM 6421	-
	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	JCM 6425	-
60	<i>Bacteroides</i>	<i>fragilis</i>	ATCC 25285	-
	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	IFO 3972	-
	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	IFO 3134	-

65

ES 2 321 602 T3

TABLA 1-2

Capacidad de utilización de dextrano de bacterias entéricas relacionadas

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Nombre bacteriano		Nombre de la cepa bacteriana	Capacidad de utilizar dextrano
<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>	JCM 1275	-
	<i>angulatum</i>	JCM 7096	-
	<i>animalis</i>	JCM 1190	-
	<i>asteroides</i>	JCM 8230	-
	<i>bifidum</i>	JCM 1209	-
	<i>boum</i>	JCM 1211	-
	<i>breve</i>	JCM 1192	-
	<i>catenulatum</i>	JCM 1194	-
	<i>choerinum</i>	JCM 1212	-
	<i>coryneforme</i>	JCM 5819	-
	<i>cuniculi</i>	JCM 1213	-
	<i>dentium</i>	JCM 1195	-
	<i>gallicum</i>	JCM 8224	-
	<i>gallinarum</i>	JCM 6291	-
	<i>indicum</i>	JCM 1302	-
	<i>infantis</i>	JCM 1222	-
	<i>longum</i>	JCM 1217	-
	<i>magnum</i>	JCM 1218	-
	<i>merycicum</i>	JCM 8219	-
	<i>minimum</i>	JCM 5821	-
	<i>pseudocatenulatum</i>	JCM 1200	-
	<i>pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	JCM 5820	-
	<i>pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	JCM 1205	-
	<i>pullorum</i>	JCM 1214	-
	<i>ruminantium</i>	JCM 8222	-
	<i>saeculare</i>	JCM 8223	-
	<i>subtile</i>	JCM 5822	-
	<i>suis</i>	JCM 1269	-
	<i>thermophilum</i>	JCM 1207	-

55

Además, usando dos cepas de *L. casei* subsp. *casei*, se determinó una diferencia de las capacidades de utilización según los dextranos que tenían diferentes pesos moleculares. Como resultado, para todos los dextranos ensayados, se confirmaron las capacidades de utilización de dextrano. Sin embargo, un dextrano con un peso molecular menor tiene tendencia a ser más utilizado. (Ver la tabla 2).

60

65

ES 2 321 602 T3

TABLA 2

Diferencia de la capacidad de utilización según el peso molecular del dextrano

	Dextrano	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	
	Peso molecular	JCM 1134	JCM 8129
5	2.000	+++	+++
10	4.000	+++	+++
	7.000	++	++
15	10.000	++	++
	14.000	++	++
	40.000	++	++
20	200.000	+	+
	2.000.000	+	+

25 Ejemplo 3

Efecto del dextrano sobre el número de bacterias de L. casei subsp. casei en heces de ratón

30 Se dividieron 12 ratones machos BALB/c de ocho semanas de edad en dos grupos de seis cada uno. Esos grupos se refirieron como (1) grupo control y (2) grupo de dextrano. A lo largo del periodo de prueba desde el inicio de la prueba, se dio un pienso convencional a (1), mientras que se dio a (2) un pienso convencional con dextrano añadido (75 mg de dextrano/kg de pienso convencional). A lo largo del periodo de tres días desde el inicio de la prueba, se inocularon por vía oral *L. casei* subsp. *casei* a ambos grupos (10^6 células/ratón). En el día 28, cada ratón se disecó, y se recogieron las heces del intestino grueso. Se hicieron diluciones en serie de las heces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y la mezcla resultante se extendió sobre medio LB con dextrano añadido, seguido por cultivo a 37°C durante 48 horas. Después de haber teñido las colonias mediante tinción de Gram y haberlas observado, se contó el número de bacterias de *L. casei* subsp. *casei* en las heces. Como resultado, el número de bacterias de *L. casei* subsp. *casei* en el grupo de dextrano era significativamente mayor que en el grupo control. (Ver la figura 1).

40 Ejemplo 4

Mejora de la inmunidad humoral por dextrano en la administración oral de antígeno

45 Se dividieron 30 ratones machos BALB/c de ocho semanas de edad en cinco grupos de seis cada uno. Esos grupos se refirieron como (1) grupo control, (2) grupo BSA (seroalbúmina bovina), (3) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei*, (4) grupo BSA + dextrano, y (5) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano. A lo largo del periodo de prueba desde el inicio de la prueba, se dio un pienso convencional a cada uno de (1), (2) y (3), mientras que se dio a cada uno de (4) y (5) un pienso convencional con dextrano añadido (75 mg de dextrano/kg de pienso convencional). A lo largo del periodo de tres días desde el inicio de la prueba, se inocularon por vía oral *L. casei* subsp. *casei* a (3) y (5) (10^6 células/ratón). En los días tres y cuatro, se disolvió BSA en PBS a una concentración de 10 mg/ml, y la solución se administró por vía oral (1 mg (100 μ l)/ratón) a de (2) a (5). En los días 33 y 34, de una manera similar a la de los días tres y cuatro, se administró BSA por vía oral (1 mg/ratón). Cinco días después de la administración, la sangre se extrajo de la vena suborbital, y se determinó el título del anticuerpo anti-BSA mediante ELISA. Como resultado, en (5) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano, el título del anticuerpo específico era significativamente mayor. (Ver figura 2).

60 Ejemplo 5

Mejora de la inmunidad celular por dextrano en la administración oral de antígeno

65 Se dividieron 30 ratones machos BALE/c de ocho semanas de edad en cinco grupos de seis cada uno. Esos grupos se refirieron como (1) grupo control, (2) grupo BSA, (3) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei*, (4) grupo BSA + dextrano, y (5) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano. A lo largo del periodo de prueba desde el inicio de la prueba, se dio un pienso convencional a cada uno de (1), (2) y (3), mientras que se dio a cada uno de (4) y (5) un pienso convencional con dextrano añadido (75 mg de dextrano/kg de pienso convencional). A lo largo del periodo de tres días

ES 2 321 602 T3

desde el inicio de la prueba, se inocularon por vía oral *L. casei* subsp. *casei* a (3) y (5) (10^6 células/ratón). En los días tres y cuatro, se disolvió BSA en PBS a una concentración de 10 mg/ml, y la solución se administró por vía oral (1 mg (100 μ l)/ratón) a de (2) a (5). En los días 33 y 34, de una manera similar a la de los días tres y cuatro, se administró BSA por vía oral (1 mg/ratón). Cinco días después de la administración, se disolvió BSA en PBS, y la solución se administró por vía intradérmica en el lóbulo de la oreja, seguido por medida del espesor del lóbulo de la oreja del ratón después de 24, 48 y 72 horas. Como resultado, en (5) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano, el espesor del lóbulo de la oreja aumentó significativamente. (Ver figura 3).

10 Ejemplo 6

Mejora de la inmunidad humoral por dextrano en la administración subcutánea de antígeno

Se dividieron 30 ratones machos BALB/c de ocho semanas de edad en cinco grupos de seis cada uno. Esos grupos se refirieron como (1) grupo control, (2) grupo BSA, (3) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei*, (4) grupo BSA + dextrano, y (5) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano. A lo largo del periodo de prueba desde el inicio de la prueba, se dio un pienso convencional a cada uno de (1), (2) y (3), mientras que se dio a cada uno de (4) y (5) un pienso convencional con dextrano añadido (75 mg de dextrano/kg de pienso convencional). A lo largo del periodo de tres días desde el inicio de la prueba, se inocularon por vía oral *L. casei* subsp. *casei* a (3) y (5) (10^6 células/ratón). En el día tres, usando FIA (adyuvante incompleto de Freund), se emulsionó PBS (solución salina tamponada con fosfato) (PBS + FIA) o BSA (5 mg/ml) (BSA + FIA) en una relación 1:1, y se administró la emulsión de PBS + FIA por vía subcutánea en las almohadillas plantares de (1) y se administró la emulsión de BSA + FIA por vía subcutánea en aquellas de (2) a (5), respectivamente (200 μ l/ratón). En el día 35, se dio una dosis de recuerdo en una manera similar a la del día tres. Cinco días después de la dosis de recuerdo, se extrajo sangre de la vena suborbital, y se determinó el título del anticuerpo anti-BSA mediante ELISA. Como resultado, en (5) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano, el título del anticuerpo específico era significativamente mayor. (Ver figura 4).

30 Ejemplo 7

Mejora de la inmunidad celular por dextrano en la administración subcutánea de antígeno

Se dividieron 30 ratones machos BALB/c de ocho semanas de edad en cinco grupos de seis cada uno. Esos grupos se refirieron como (1) grupo control, (2) grupo BSA, (3) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei*, (4) grupo BSA + dextrano, y (5) grupo BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano. A lo largo del periodo de prueba desde el inicio de la prueba, se dio un pienso convencional a cada uno de (1), (2) y (3), mientras que se dio a cada uno de (4) y (5) un pienso convencional con dextrano añadido (75 mg de dextrano/kg de pienso convencional). A lo largo del periodo de tres días desde el inicio de la prueba, se inocularon por vía oral *L. casei* subsp. *casei* a (3) y (5) (10^6 células/ratón). En el día tres, usando FIA, se emulsionó PBS (PBS + FIA) o BSA (5 mg/ml) (BSA + FIA) en una relación 1:1, y se administró la emulsión de PBS + FIA por vía subcutánea en las almohadillas plantares de (1) y se administró la emulsión de BSA + FIA por vía subcutánea en aquellas de (2) a (5), respectivamente (200 μ l/ratón). En el día 35, se dio una dosis de recuerdo en una manera similar a la del tercer día. Cinco días después de la dosis de recuerdo, se disolvió BSA en PBS, y la solución se administró por vía intradérmica en el lóbulo de la oreja del ratón, seguido por medida del espesor del lóbulo de la oreja después de 24, 48, y 72 horas. Como resultado, en (5) grupo de BSA + *L. casei* subsp. *casei* + dextrano, el espesor del lóbulo de la oreja aumentó significativamente. (Ver figura 5).

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se pueden sostener una variedad de actividades biológicas originadas en *L. casei* subsp. *casei* en un organismo vivo mediante crecimiento-proliferación y colonización selectiva de *L. casei* subsp. *casei* en el intestino de un ser humano, animal, o similar o mediante crecimiento-proliferación selectiva de *L. casei* subsp. *casei* en el intestino, sin suministrar *L. casei* subsp. *casei* de forma continua.

55

60

65

ES 2 321 602 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición para fomentar la proliferación bacteriana para la proliferación selectiva de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* que comprende un dextrano y *Lactobacillus casei* subsp. *casei*.

2. La composición para fomentar la proliferación bacteriana según la reivindicación 1, en donde el dextrano tiene un peso molecular de 2.000 a 40.000.000.

10 3. Una composición farmacéutica que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana según la reivindicación 1 ó 2.

4. Un alimento natural que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana según la reivindicación 1 ó 2.

15 5. Un pienso que comprende la composición para fomentar la proliferación bacteriana según la reivindicación 1 ó 2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

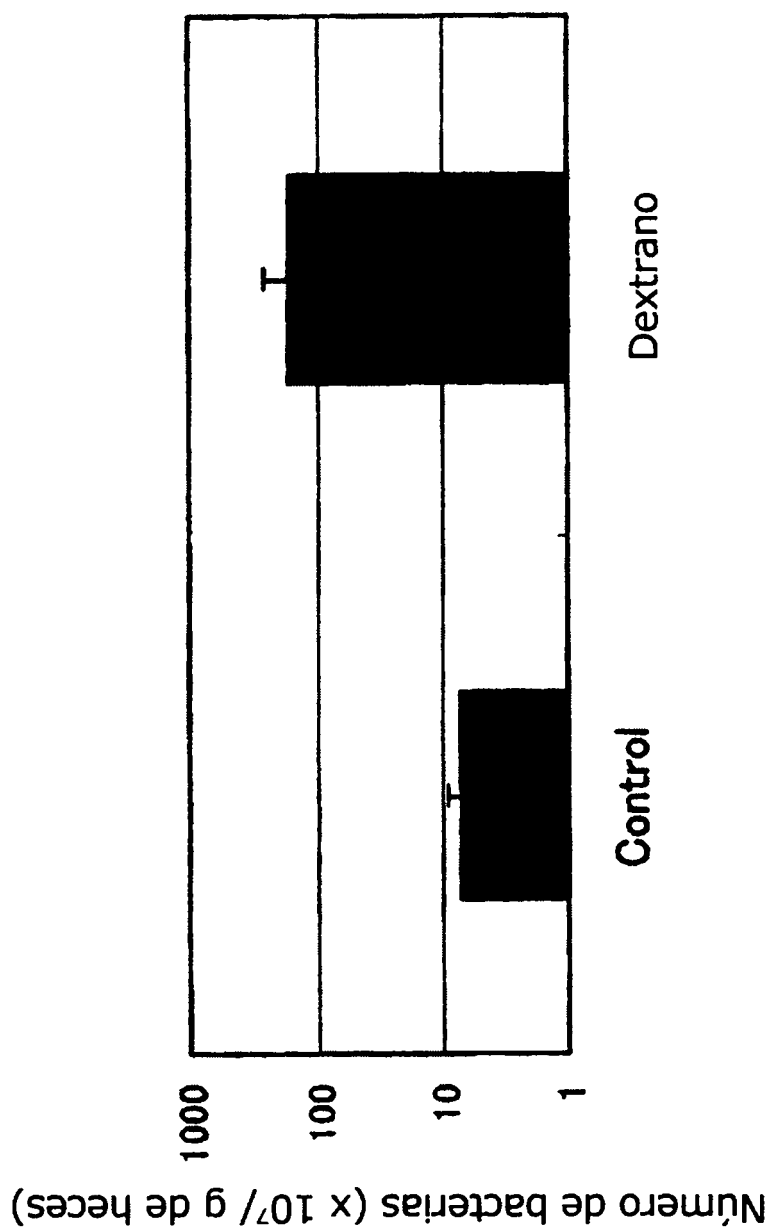


Fig. 1

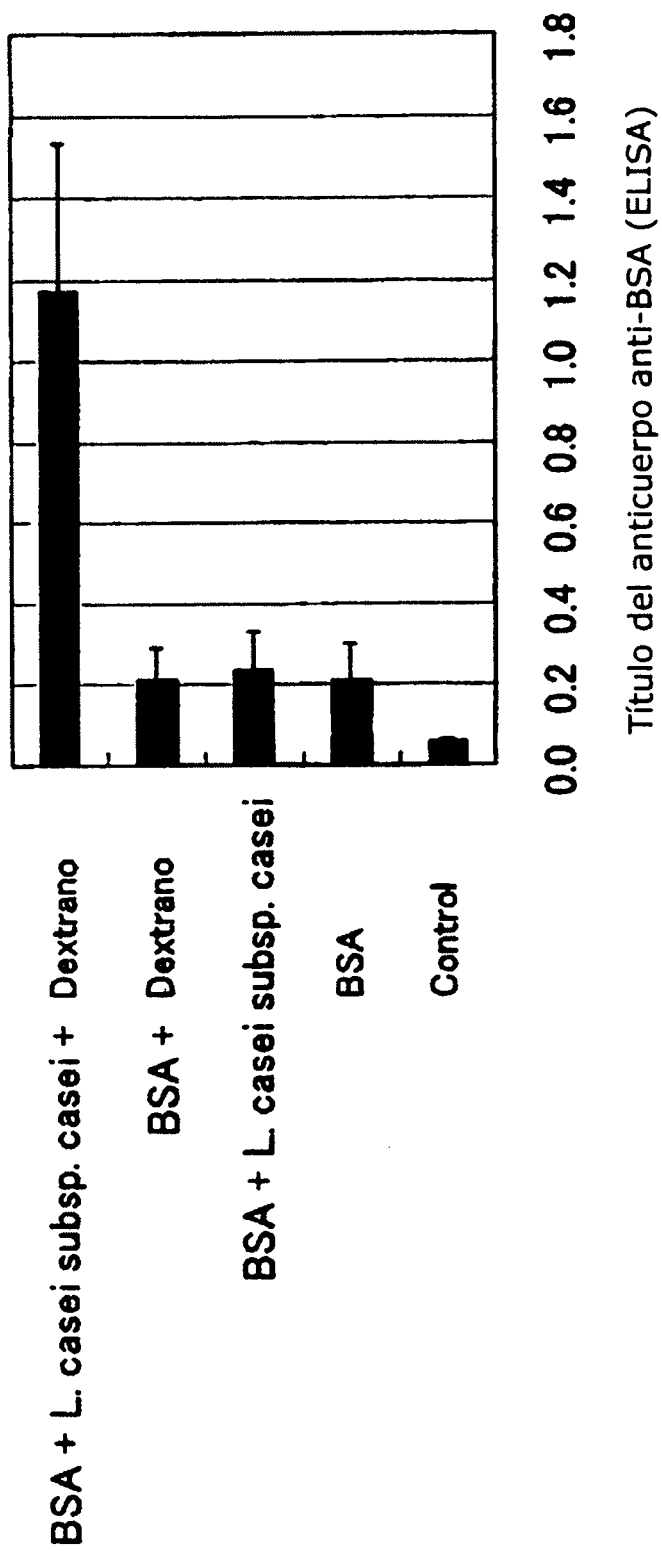


Fig. 2

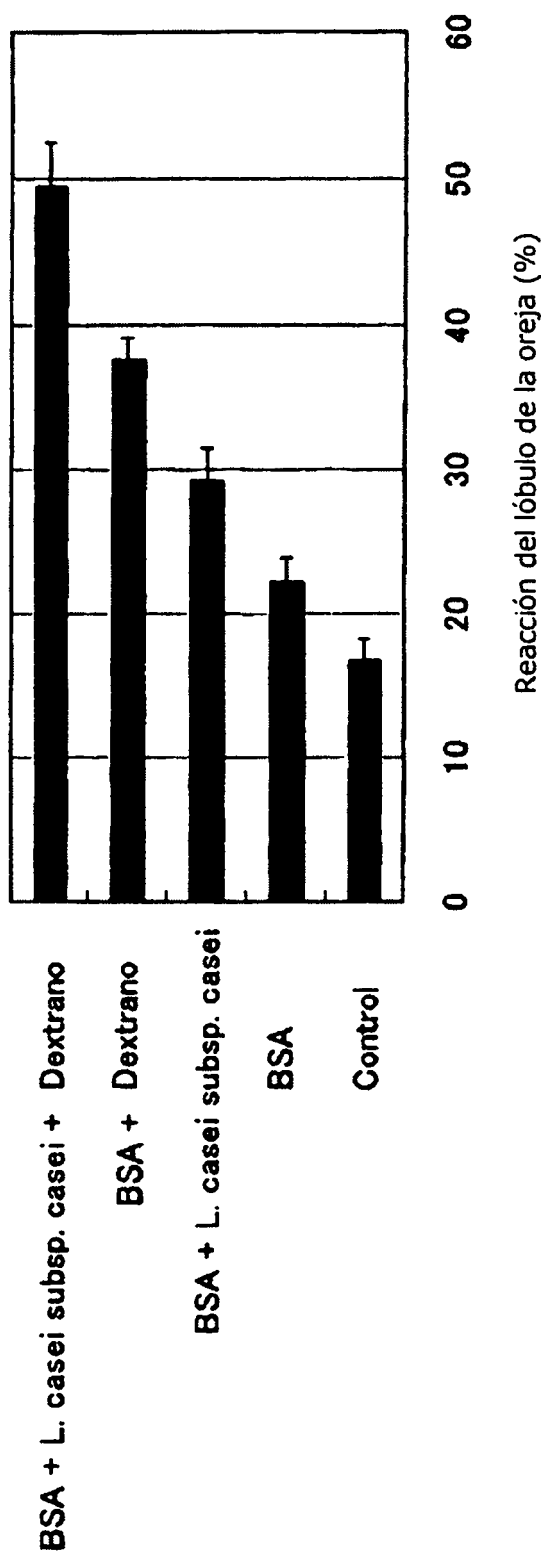


Fig. 3

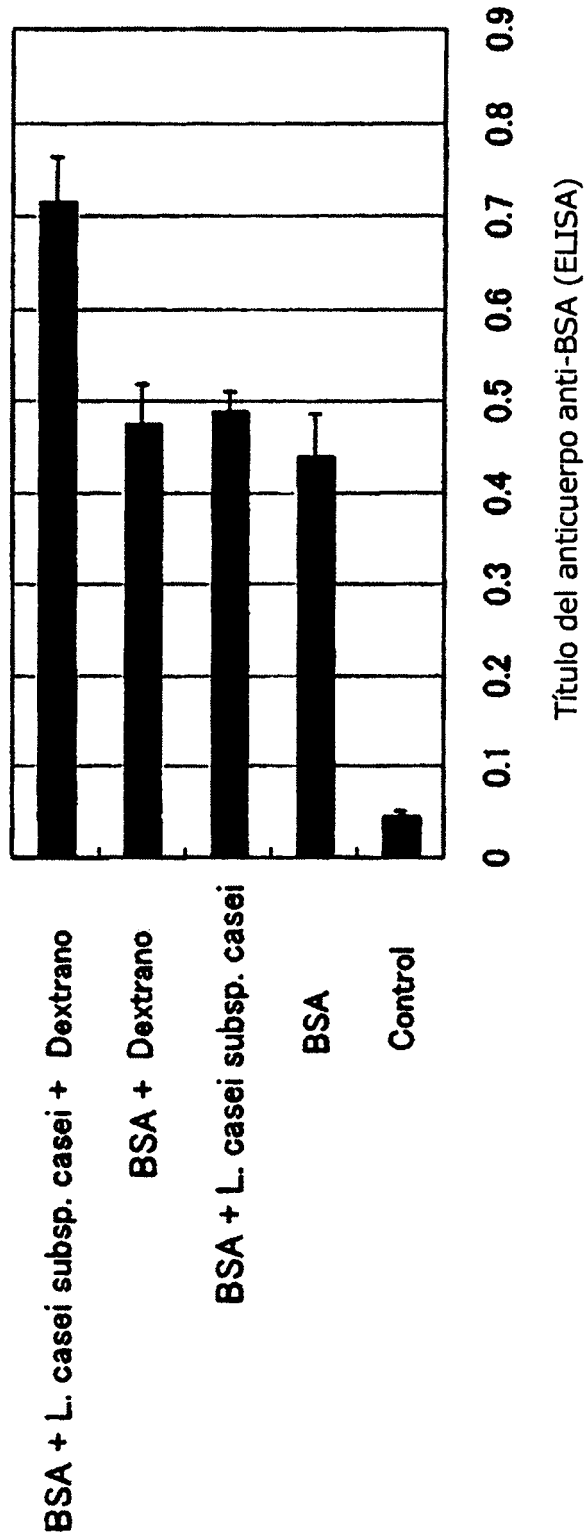


Fig. 4

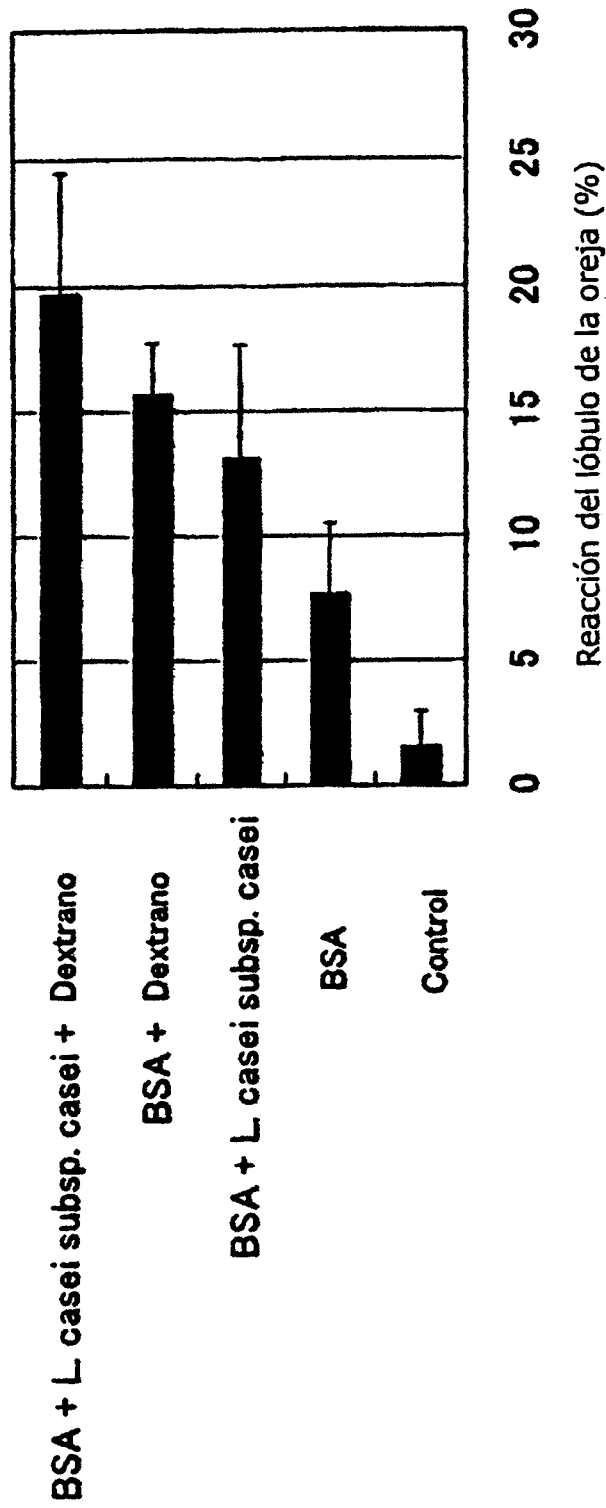


Fig. 5