

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 914**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 35/742 (2015.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2018** **PCT/JP2018/020245**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2018** **WO18216818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2018** **E 18805833 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024** **EP 3632453**

54 Título: **Agente para mejorar la calidad muscular**

30 Prioridad:

26.05.2017 JP 2017105116

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2024

73 Titular/es:

JAPAN ECO-SCIENCE CO. LTD. (25.0%)

**211, 11-1, ShiomigaokachoChuo-kuChiba-shi
Chiba 260-0034, JP;**

**KEIYO GAS ENERGY SOLUTION CO., LTD.
(25.0%);**

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA
UNIVERSITY (25.0%) y**

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
KANAZAWAUNIVERSITY (25.0%)**

72 Inventor/es:

KODAMA HIROAKI;

SATO NARUKI;

NISHIUCHI TAKUMI;

MIYAMOTO HIROKUNI;

ITO TOSHIYUKI y

MORI KENICHI

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 992 914 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

Agente para mejorar la calidad muscular

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a un modificador muscular que puede utilizarse como producto farmacéutico, alimento, aditivo alimentario, pienso y aditivo para piensos. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Técnica antecedente

10 En los últimos años, con el desarrollo de la tecnología de análisis integral de la información biológica, la llamada tecnología ómica, basada en el rápido progreso de la tecnología de análisis y la tecnología de análisis de datos, la relación entre la microbiota intestinal, es decir, la flora intestinal, el metabolismo y la función fisiológica del animal huésped, y la patología, se está aclarando rápidamente.

15 Una gran variedad de bacterias intestinales habitan en el tracto intestinal, interactuando con las células intestinales del huésped para formar un ecosistema intestinal complejo, y el mantenimiento de su homeostasis contribuye a mantener la salud humana. Por otra parte, se ha informado de que cuando se altera el equilibrio, se producen no sólo enfermedades relacionadas con el intestino, como la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer de colon, sino también enfermedades sistémicas, como alergias y enfermedades metabólicas (Literatura no de patente 1).

20 También, como hallazgos epidemiológicos, por ejemplo, se ha reportado un hallazgo de que las composiciones de la microbiota en las heces de sujetos de edad avanzada se agrupan de acuerdo con el lugar de residencia y el contenido de las comidas, y también la división de la composición de la microbiota muestra una correlación significativa con los resultados de determinación de la debilidad muscular, comorbilidad, estado nutricional, marcador de inflamación, metabolitos en el agua fecal, y similares (Literatura no de patente 2).

25 Por otro lado, los inventores ya han comprobado que, en la divulgación e investigación que precedió a la presente divulgación, las bacterias complejas ATCC PTA-1773 derivadas de un producto de fermentación a alta temperatura encontradas por ellos mismos y *Bacillus hisashii* NITE BP-863 se administran respectivamente por vía oral como probióticos, produciendo así un efecto de control de la microbiota intestinal del individuo administrado (Literatura no de patente 3) (Literatura de patente 1). La bacteria compleja ATCC PTA-1773 derivada de un producto de fermentación a alta temperatura ha sido depositada internacionalmente en ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 USA) el 1 de mayo de 2000 (Número de acceso: PTA-1773). Además, el *Bacillus hisashii* NITE BP-863 ha sido depositado internacionalmente en el National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository (NPMO) (2-5-8 Kazusakamata, Kisarazu-shi, Chiba, Japón, 292-0818) el 15 de enero de 2010 (Nº de acceso NITE BP-863).

35 Como resultado de la administración de las bacterias complejas termófilas NITE BP-1051 obtenidas de las bacterias complejas ATCC PTA-1773 derivadas de un producto de fermentación a alta temperatura y *Bacillus hisashii* NITE BP-863 en la investigación y desarrollo subsiguiente, los inventores han comprobado como nuevo hallazgo que, después de que se causaran cambios en la microbiota intestinal, se causan cambios fisiológicos que acompañan a la modificación muscular en el lado del individuo administrado. Además, la bacteria compleja termófila NITE BP-1051 ha sido depositada internacionalmente en el National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository (NPMO) (2-5-8 Kazusakamata, Kisarazu-shi, Chiba, Japón, 292-0818) el 18 de enero de 2011 (Nº de acceso NITE BP-1051).

40 La modificación muscular aquí no se limita a cambios en la masa muscular (peso y volumen), como se ejemplifica más adelante, sino que significa que se provocan cambios a nivel biológico bioquímico/molecular en las fibras musculares del tejido y las células musculares, por ejemplo, a través de un mecanismo regulador a nivel de expresión de un gen que codifica una proteína muscular.

45 En cuanto al efecto que las bacterias complejas ATCC PTA-1773 derivadas de un producto de fermentación a alta temperatura, y las bacterias complejas termófilas NITE BP-1051 obtenidas de PTA-1773 y *Bacillus hisashii* NITE BP-863 causan en la modificación muscular por administración oral, no hay ninguna descripción en la que pueda presumirse tal efecto en patentes y documentos relacionados con el estado de la técnica, y en ese sentido, puede decirse que la tecnología basada en la presente divulgación es una tecnología diferente del estado de la técnica.

50 Además, las técnicas anteriores que afectan al músculo del individuo administrado mediante la administración oral de un microorganismo probiótico incluyen las siguientes.

En la Literatura de Patente 2, se afirma que la masa muscular y la cantidad de acción de los ratones se modifican mediante la administración oral de *Lactobacillus gasseri*.

Además, se ha informado que las propiedades físicas, el pH y la composición de nutrientes de los músculos de pollos de engorde se ven afectados por, la administración oral de tres especies de *Bacillus* en la Literatura no de Patente 4, y la administración oral de *Bacillus subtilis* en la Literatura no de Patente 5, respectivamente.

- 5 Sin embargo, todas estas tecnologías anteriores son fundamentalmente diferentes en el sentido de que la modificación de las proteínas constituyentes del músculo no está dirigida, en comparación con el modificador muscular de la presente divulgación que logra la modificación muscular de un individuo administrado por vía oral.

Lista de citas

Literatura de patentes

- 10 Literatura de patente 1: JP 2016-204355 A
Literatura de patente 2: JP 2016-84358 A
Literatura de patente 3: JP 2016-216408 A
Literatura de patente 4: JP2009100728
Literatura de patente 5: JP2011101597
Literatura de patente 6: JP5578375B
15 Literatura de patente 7: CN103416585
Literatura de patente 8: JP2008113652

Literatura no de patentes

- 20 Literatura no de patente 1: Shingo Fukuda. "Hacia la comprensión y regulación del ecosistema intestinal mediante la metabologenómica" Journal of Japanese Biochemical Society 88.1 (2016): 61-70.
Literatura no de patente 2: Claesson, Marcus J., et al. "La composición de la microbiota intestinal se correlaciona con la dieta y la salud en los ancianos." Nature 488.7410 (2012): 178-184.
Literatura no de patente 3: El Programa de Avance de Tecnología Estratégica Básica del Ministerio de Economía, Comercio e Industria para el año fiscal 2009 "Desarrollo de tecnología de fabricación de piensos fermentados de alta funcionalidad utilizando recursos marinos residuales y residuos de procesamiento de alimentos"
25 Literatura no de patente 4: Zhou, Xianjian, et al. efectos de la suplementación dietética con probióticos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus natto*) en el desarrollo muscular y la calidad de la carne de pollos de engorde". "Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 39.2 (2015): 203-210.
Literatura no de patente 5: Abdulla, Nazim Rasul, et al. "Propiedades fisicoquímicas del músculo pectoral en pollos de engorde alimentados con probióticos, antibióticos o mezcla de antibiótico y probiótico" Journal of Applied
30 Animal Research 45.1 (2017): 64-70.
Literatura no de patente 6: YANG, J. et al., "Efectos de la suplementación con *Bacillus subtilis* KT260179 enriquecido con cromo sobre el crecimiento de los pollos, los parámetros lipídicos plasmáticos, los niveles de cromo en los tejidos, la composición bacteriana cecal y la calidad de la carne de la pechuga", Lipids in Health and Disease, (2016)200, vol. 15, nº 1.
35 Literatura no de patente 7: MIRIAM VAN DIJK ET AL, "Mejora de la función y calidad muscular tras una intervención dietética con suero enriquecido con leucina y antioxidantes en ratones ancianos con deficiencia de antioxidantes", ONCOTARGET, (2016)0405, vol. 7, nº 14.
Literatura no de patente 8: YI-MING CHEN ET AL, "La suplementación con *Lactobacillus plantarum* TWK10 mejora el rendimiento físico y aumenta la masa muscular en ratones", NUTRIENTS, (2016)0407, vol. 8, nº 4.

Problemas técnicos

- 40 Como premisa de la presente divulgación, existe una situación en la que un problema de, por así decirlo, "reserva de enfermedad", un tipo de daño que se acumula poco a poco en la vida diaria, diferente de las "enfermedades" que se tratan activamente con fármacos o similares, como el síndrome de fatiga crónica cuya mayor queja y causa principal no están claras, y el síndrome metabólico como enfermedad relacionada con el estilo de vida, se ha hecho evidente
45 en la sociedad moderna.

En los últimos años se ha hecho hincapié en la mejora de la función física y el mantenimiento de la salud a través de la alimentación, lo que se conoce como "una dieta equilibrada conduce a un cuerpo sano (Ishoku-dougen)". Así pues, se espera la aparición de tecnologías y productos que encarnen científicamente el Ishoku-dougen y contribuyan a mantener y desarrollar la salud de la sociedad en su conjunto.

- 50 La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, contribuye a resolver los problemas descritos anteriormente mediante la idea de microorganismos probióticos.

Solución a los problemas

- 55 La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, resuelve los problemas con un modificador muscular caracterizado por provocar un cambio cualitativo en las fibras musculares de un individuo administrado por vía oral a un individuo humano o animal.

El modificador muscular garantiza su funcionalidad al contener un producto de fermentación por microorganismos, o células vivas separadas o aisladas o células muertas, y un producto obtenido mediante una operación como la extracción, separación, replicación o procesamiento a partir del producto de fermentación, células vivas o células muertas.

5 En una realización de la presente divulgación es posible proporcionar un modificador muscular que puede ser ingerido como bacteria viva de *Bacillus hisashii* NITE BP-863 en una cantidad equivalente a 10^2 a 10^9 células/kg de peso corporal del huésped/día, o células muertas que exhiben funciones equivalentes a la cantidad de células vivas, y como producto secundario obtenido mediante una operación como extracción, separación, replicación o procesamiento a partir de las células vivas o células muertas.

10 En una realización de la presente divulgación, es posible proporcionar un modificador muscular que puede ser ingerido como producto de fermentación obtenido añadiendo la totalidad o parte de la bacteria compleja NITE BP-1051 o la totalidad o parte de la bacteria compleja ATCC PTA-1773 a un sustrato de fermentación apropiado, y haciéndolo pasar por un proceso de fermentación, en una cantidad equivalente a 0,0001 a 10 g/kg de peso corporal del huésped/día, o células vivas o células muertas que presenten funciones equivalentes a la cantidad de producto de fermentación, y un
15 producto secundario obtenido mediante una operación como extracción, separación, replicación o procesamiento a partir del producto de fermentación, células vivas o células muertas.

Sin embargo, es deseable que la cantidad real de aplicación del modificador muscular se determine en función del estado de la microbiota intestinal de cada especie animal e individuo.

20 Por ejemplo, es posible confirmar los cambios en un entorno intestinal debidos a la administración de un modificador muscular mediante una verificación genética molecular o química analítica de la microbiota intestinal. Por lo tanto, para el individuo administrado, es deseable determinar la dosis óptima para un individuo o un grupo de individuos que crecen en un entorno similar con referencia al rango de concentración descrito anteriormente, teniendo en cuenta dichos datos y los hallazgos fisiológicos reales.

25 Cuando es difícil llevar a cabo tal verificación de análisis, es deseable determinar una dosis provisional con referencia al conocimiento en el caso de administración a sujetos similares, y determinar la dosis óptima para un individuo o un grupo de individuos que crecen en un entorno similar con referencia al rango de concentración descrito anteriormente variando la dosis según la condición del individuo administrado después del inicio de la administración, y observando cuidadosamente la mejora acompañante en los hallazgos fisiológicos.

30 Ya se ha demostrado en el estado de la técnica que todos estos modificadores musculares se utilizan para la administración oral a un individuo humano o animal, pasando así a través del tracto gastrointestinal superior del individuo administrado sin perder su actividad y alcanzando el tracto intestinal para controlar la microbiota interna.

35 Si la microbiota intestinal del individuo administrado cambia debido al modificador muscular, entonces cambia una interacción entre un grupo microbiano que constituye la microbiota intestinal y las células intestinales a través de moléculas señal, y la información se transmite a un cuerpo huésped, por lo que cambian varios metabolismos en cada tejido del cuerpo huésped.

40 El modificador muscular basado en la presente divulgación aumenta, por ejemplo, la proporción de abundancia de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o *Racnospira* entre la microbiota intestinal del individuo administrado, o la proporción de abundancia de una especie específica de estos géneros, con lo que cambia la interacción entre las bacterias y las células intestinales a través de moléculas de señalización, y la información se transmite a un cuerpo huésped, con lo que cambian diversos metabolismos en cada tejido del cuerpo huésped.

45 Además, el modificador muscular basado en la presente divulgación disminuye, por ejemplo, la proporción de abundancia de los géneros *Clostridium*, *Streptococcus* o *Enterococcus* entre la microbiota intestinal del individuo administrado, o la proporción de abundancia de una especie específica de estos géneros, con lo que cambia la interacción entre las bacterias y las células intestinales a través de moléculas de señalización, y la información se transmite a un cuerpo huésped, con lo que cambian diversos metabolismos en cada tejido del cuerpo huésped.

50 Debido al cambio general en la abundancia de bacterias de cada género y cada especie, incluidos los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Streptococcus*, por el modificador muscular basado en la presente divulgación, la interacción entre el grupo microbiano que constituye la microbiota intestinal y las células intestinales a través de la molécula de señal cambió y la información se transmitió al cuerpo del huésped. Como resultado, se produce el fenómeno de que cambia el contenido de una proteína específica en las fibras musculares, mediante la acción de una señal de expresión de una proteína relacionada con el músculo o similar en las células que constituyen las fibras musculares.

Las fibras musculares esqueléticas de mamíferos se dividen a grandes rasgos en fibras musculares de tipo I (músculo lento) y de tipo II (músculo rápido) en función de sus propiedades fisiológicas y de la miosina que contienen.

55 Las fibras musculares de tipo I son ricas en mitocondrias y experimentan una contracción sostenida utilizando oxígeno.

Por otro lado, las fibras musculares de tipo II tienen relativamente pocas mitocondrias y experimentan una contracción instantánea por glucólisis. Las fibras musculares de tipo II se subdividen a su vez en fibras musculares IIa, IIb y IIc, en las que las primeras presentan características musculares más lentas.

5 La troponina T es una proteína marcadora muy eficaz para separar los tipos de fibras musculares porque expresa (contiene) isoformas distintas, diferentes entre sí, en las fibras de músculo rápido, lento y del miocardio.

Por ejemplo, dado que el modificador muscular proporcionado por la presente divulgación desplaza la isoforma de troponina T del tipo fTnT1 al tipo fTnT3 en las fibras musculares del animal administrado, las fibras musculares de tipo II pueden dotarse de características de músculo lento (tipo IIa).

10 Además, se sabe que el contenido de mioglobina en las fibras musculares aumenta a medida que aumenta la relación entre las fibras musculares de tipo I y las fibras musculares de tipo IIa y, por ejemplo, el modificador muscular proporcionado por la presente divulgación puede aumentar arbitrariamente el contenido de mioglobina en las fibras musculares del animal administrado.

15 Como se ha descrito anteriormente, es extremadamente importante que el modificador muscular basado en la presente divulgación cambie las fibras musculares del animal administrado a características similares al tipo IIa en términos de mantenimiento de la motilidad en la vida diaria.

20 A medida que aumenta la edad, las fibras musculares de tipo II se degeneran. En cambio, las fibras musculares de tipo I se mantienen relativamente. Por lo tanto, una disminución de la motilidad debida al envejecimiento se manifiesta no en una fase de movimiento relativamente lento como la actividad de la vida diaria, en la que se utilizan principalmente las fibras musculares de tipo I, sino en forma de disminución de la agilidad y la instantaneidad debida principalmente a las fibras musculares de tipo II.

El entrenamiento de fuerza para las personas mayores se considera importante para prevenir la disminución de la motilidad con el envejecimiento. El entrenamiento de fuerza para personas mayores muestra una tendencia a la hipertrofia muscular en una fase temprana, pero la mayoría de estos aumentos de fuerza se atribuyen a factores neurales.

25 Con el entrenamiento continuo, se observa cierta hipertrofia de las fibras musculares de tipo II incluso en los ancianos, pero la mayoría de las actividades físicas cotidianas de los ancianos son acciones que dependen de las fibras musculares de tipo I, y cuando el entrenamiento es intermitente, se supone que las fibras musculares de tipo II vuelven a atrofiarse sin ser utilizadas.

Efectos ventajosos

30 En el modificador muscular basado en la presente divulgación, cuando a las fibras musculares de tipo II se les imparten características de músculo lento (cercanas al tipo IIa), las fibras musculares de tipo II pueden utilizarse más eficazmente incluso bajo intensidad de ejercicio diario, y traer como resultado un efecto positivo en el mantenimiento de la fuerza muscular en los ancianos.

35 Así, cuando el uso del modificador muscular basado en la presente divulgación aporta un efecto positivo sobre el mantenimiento de la fuerza muscular en los ancianos, pueden esperarse efectos preventivos y de mejora sobre las condiciones patológicas acompañadas de atrofia muscular, como la sarcopenia, la debilidad muscular y el síndrome locomotor.

40 Además, el modificador muscular basado en la presente divulgación cambia las fibras de músculo rápido del animal administrado a características similares a las del tipo IIa, por ejemplo, aumentando así la motilidad aeróbica de los animales de ganado, contribuyendo a una mejora del metabolismo y aportando un efecto de producción fácil de carne relativamente baja en grasa y rojiza.

Además, las características físicas derivadas de la estructura de las fibras musculares cambian, lo que también afecta a la textura y flexibilidad de la carne y, como resultado, puede mejorarse la calidad de la carne.

Breve descripción de los dibujos

45 La Fig. 1 es un patrón de migración de proteínas por electroforesis unidimensional en el Ejemplo 1 de la presente realización.

La Fig. 2 es una parte de un patrón de migración de proteínas por electroforesis bidimensional en el Ejemplo 1 de la presente realización.

50 La Fig. 3 es una parte de un patrón de migración de proteínas por electroforesis bidimensional del Ejemplo 2 de la presente realización.

La Fig. 4 es un diagrama conceptual de la eficacia de un modificador muscular de la presente divulgación.

Descripción de las realizaciones

Ejemplo 1**(Preparación del lisado del producto de fermentación de bacterias termófilas)**

Se preparó un producto de fermentación a alta temperatura que contenía bacterias complejas ATCC PTA-1773 diluyéndolo 100 veces en volumen con agua del grifo y sometiénolo a un tratamiento de aireación a 60°C durante 10 horas o más.

(Alimentación de cerdos con lisado)

El lisado preparado que contenía la bacteria compleja ATCC PTA-1773 se mezcló en una tubería de suministro de agua de una instalación de cría de cerdos a una concentración del 0,4% en relación de volumen con respecto al agua potable, y luego la mitad de los cerdos de la instalación de cría de cerdos fueron alimentados con agua potable (grupo de alimentación con lisado), y la otra mitad de los cerdos recibieron agua potable sin mezclar (grupo de control).

(Preparación de la muestra de muslo de cerdo)

Los muslos de los cerdos de prueba se almacenaron a unos 0°C durante 3 días después del sacrificio y, a continuación, se recogieron muestras de músculo y se almacenaron congeladas a -80°C hasta su análisis.

Para la extracción de la proteína muscular, se pulverizaron 130 mg de tejido congelado con una trituradora por congelación y luego se suspendieron en 650 µl de extracto proteico, y la proteína se extrajo aún más con una trituradora ultrasónica.

(Análisis de la composición proteica por electroforesis)

La Fig. 1 y la Fig. 2 muestran los resultados de la separación de proteínas por electroforesis unidimensional y electroforesis bidimensional utilizando 0,6 µL del extracto proteico.

Las proteínas que mostraron movilidades diferentes entre las proteínas musculares preparadas a partir del grupo de alimentación con lisado que contenía la bacteria compleja ATCC PTA-1773 y el grupo de control se analizaron por espectrometría de masas para identificar las proteínas.

La Fig. 1 muestra un patrón de migración de proteínas por electroforesis unidimensional. La banda señalada con una flecha es la mioglobina, que aumentó aproximadamente 1,6 veces en el grupo de alimentación con lisado en comparación con el grupo de control.

La mioglobina es una proteína que transporta oxígeno a las mitocondrias, y un aumento de la mioglobina aumenta el enrojecimiento muscular, lo que indica que hay más fibras musculares de tipo I o de tipo IIa ricas en mitocondrias.

La Fig. 2 muestra una parte del patrón de migración de proteínas por electroforesis bidimensional, en la que se obtuvo un patrón particularmente diferente entre el grupo de alimentación con lisado y el grupo de control. Como resultado de la espectrometría de masas, la fTnT1 y la fTnT2 como troponina T ácida se expresaron principalmente en el grupo de control, y la fTnT3 como troponina T alcalina se expresó principalmente en el grupo de alimentación con lisado.

De los resultados en la Fig. 1 y Fig. 2, al alimentar el lisado que contiene la bacteria compleja ATCC PTA-1773, las fibras musculares del muslo de cerdo cambiaron del metabolismo energético tipo II basado en el metabolismo glicolítico original al metabolismo energético tipo IIa basado en el metabolismo aeróbico con excelente durabilidad, en el cual el metabolismo energético por mitocondrias fue activado por el aumento de mioglobina.

Ejemplo 2**(Preparación de piensos que contienen *Bacillus hisashii* NITE BP-863)**

A un cebo compuesto de harina de maíz y torta de soja como ingredientes principales y formulado y diseñado para cumplir los requisitos de nutrientes especificados en la norma japonesa de alimentación se le añadió *Bacillus hisashii* NITE BP-863 (3×10^6 /g) aislado del producto de fermentación de bacterias termófilas en una concentración del 0,01% en relación al peso para preparar un pienso.

(Cría de pollos)

Se probaron pollos de engorde machos de 10 días (rechoncho) y se criaron durante 38 días. El cebo preparado en la sección anterior (grupo de alimentación con BP-863) y uno con la misma formulación pero sin BP-863 añadido (grupo de control) se utilizaron para alimentar sin cesar y beber libremente todo el tiempo.

(Preparación del músculo pectoral superficial del pollo)

Estos pollos de engorde fueron sacrificados y desmontados el día 49 para obtener muestras de músculo pectoral superficial. Las muestras musculares se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis. Para la extracción de la

proteína muscular, se pulverizaron 20 mg de tejido congelado con una trituradora por congelación y, a continuación, se suspendieron en 100 µl de extracto proteico, y la proteína se extrajo posteriormente con una trituradora ultrasónica.

(Análisis de la composición proteica por electroforesis)

5 La Fig. 3 muestra los resultados de la separación de proteínas por electroforesis bidimensional utilizando de 1 a 2 µL del extracto proteico.

Las proteínas que mostraron movilidades diferentes entre las proteínas musculares preparadas a partir del grupo de alimentación con BP-863 y el grupo de control se analizaron por espectrometría de masas para identificar las proteínas. Como resultado, la isoforma de la troponina T de músculo rápido había cambiado, y se clasificaron en los patrones mostrados en la Fig. 3.

10 Los cuatro especímenes de los pollos del grupo de control mostraron el patrón 1, mientras que tres de los cuatro especímenes de los pollos del grupo de alimentación con BP-863 mostraron el patrón 2.

Este resultado reveló que la expresión de la isoforma de la troponina de músculo rápido T puede controlarse alimentando a la bacteria termófila *Bacillus hisashii* NITE BP-863.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso no terapéutico de al menos uno de *Bacillus hisashii* NITE BP-863 como ingrediente activo para proporcionar a las fibras musculares de tipo II características de músculo lento de tipo IIa cambiando la isoforma de troponina T de tipo fTnT1 a tipo fTnT3 en las fibras musculares de un individuo administrado, mediante administración por vía oral a un individuo humano o animal.
2. Un producto para su uso en el tratamiento de la sarcopenia, debilidad muscular y síndrome locomotor, que comprende al menos uno de *Bacillus hisashii* NITE BP-863 como ingrediente activo, mediante administración por vía oral a un individuo humano o animal.

FIG. 1

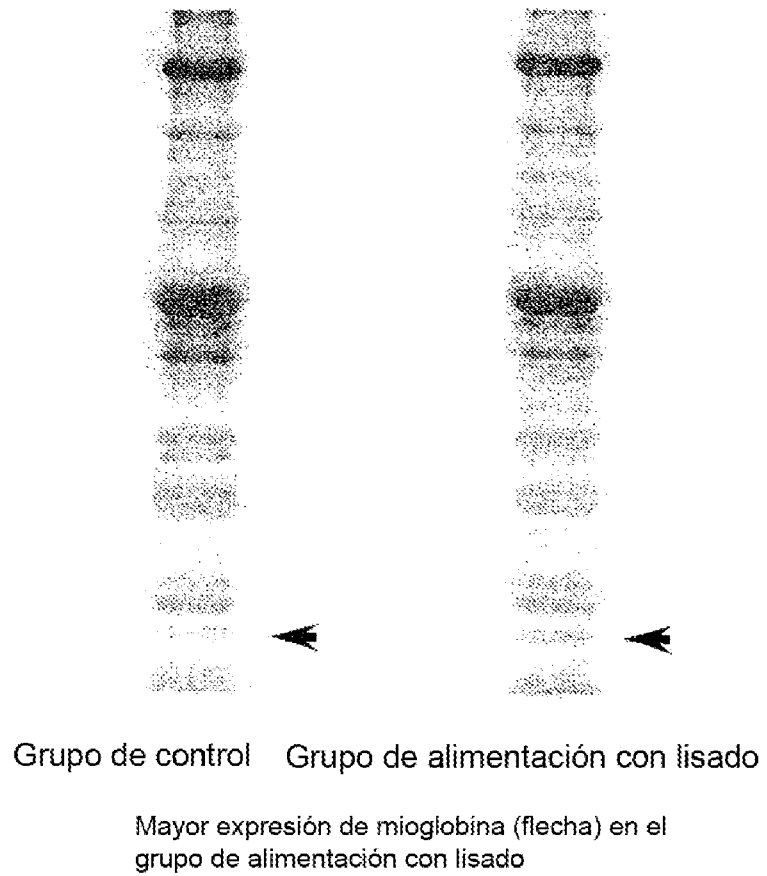


FIG. 2

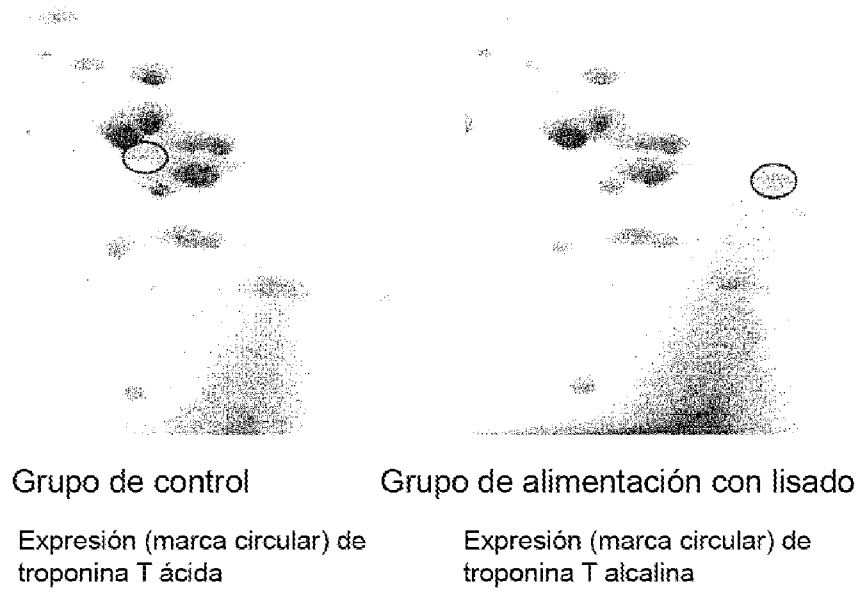
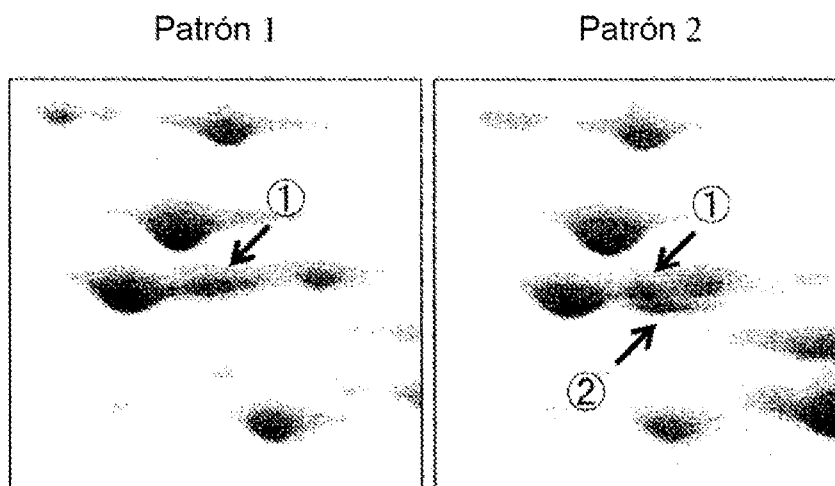


FIG. 3



Cambio de punto FTnT de ① a ② mediante alimentación de BP-863

FIG. 4

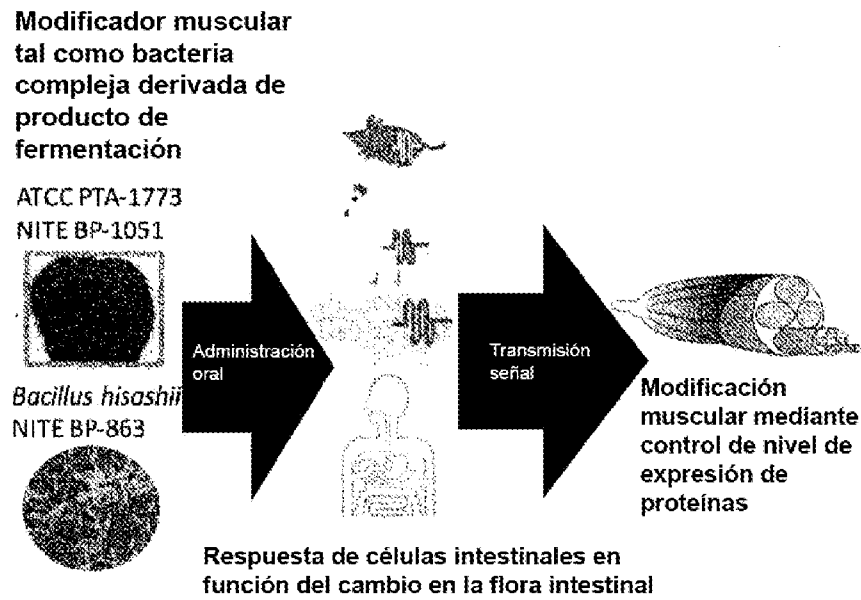


Diagrama conceptual de eficacia de modificador muscular