

**COMPOSICIÓN PARA PREVENIR, TRATAR O MEJORAR ENFERMEDADES
GASTROINTESTINALES QUE COMPRENDE UNA CEPA DEL GÉNERO
CORYNEBACTERIUM Y CULTIVO DE LA MISMA**

CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud se refiere a una composición para la prevención, el tratamiento o la mejora de un trastorno gástrico que contiene una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

La úlcera gástrica representa la incidencia más alta de lesiones gástricas, y son habituales en todo el mundo en todas las especies. La incidencia de úlcera gástrica está aumentando con el desarrollo de la industria ganadera, y junto con una disminución en la tasa de crecimiento debida a la disminución del apetito, esfuerzos para prevenir la aparición de lesiones gástricas en un aspecto de bienestar animal están consolidándose como un síntoma que acompaña a los dolores.

La treonina (Thr) es el principal aminoácido (AA) del que se compone la mucina, una sustancia protectora para el epitelio intestinal. La proteína mucina fomenta la absorción de proteínas y, al mismo tiempo, protege a los órganos digestivos de los líquidos digestivos fuertemente ácidos tales como el jugo gástrico, y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud intestinal. Se ha notificado que, de hecho, el tratamiento de pienso con Thr mejora la salud intestinal ayudando en la síntesis de mucina en lechones (documento no de patente 1).

La producción de Thr para pienso o alimento se realiza mediante un método de fermentación de microorganismos, y entonces las principales clases de microorganismos usadas incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), y similares. A pesar de que producen el mismo AA, estas dos cepas se dividen en bacterias gram-negativas y bacterias gram-positivas, respectivamente. La pared celular tanto de las bacterias gram-negativas como de las bacterias gram-positivas se compone de peptidoglicano (PG). Sin embargo, en el caso

de bacterias gram-negativas, además de PG, está presente adicionalmente una capa de lipopolisacárido (LPS) que consiste en lipoproteína y proteína, y como lípido A, está presente un antígeno somático (antígeno O) en esta capa de LPS, que es tóxico. Por tanto, en la industria farmacéutica, es esencial retirar las toxinas endógenas en fármacos parenterales con actividades biológicas perjudiciales tales como pirogenicidad, letalidad, reactividad de Schwartzman, actividad adyuvante y activación de macrófagos (documento no de patente 2).

Recientemente, la producción de aminoácidos para pienso de tipo gránulo mediante simplificación (u omisión) del procedimiento de alta purificación debido a la eficacia económica de aditivos para pienso mezcla inevitablemente las bacterias usadas para la fermentación en forma termoinactivada en el producto. Varios estudios han mostrado que las bacterias termoinactivadas de las bacterias gram-positivas representativas, las bacterias del ácido láctico, son estables con respecto al entorno con una fuerte resistencia al ácido y al calor, y son fáciles de manipular ya que es posible una alta concentración, y se usan como alimento para bacterias beneficiosas que se han establecido en los intestinos, y fortalecen de ese modo la actividad de potenciación del sistema inmunitario única para las bacterias del ácido láctico (documento no de patente 3).

Contra estos antecedentes, los presentes solicitantes han intentado desarrollar una composición farmacéutica que tenga un efecto en la prevención y el tratamiento de un trastorno gástrico, y como resultado, han confirmado que una composición que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina es eficaz en la prevención, el tratamiento y la mejora de un trastorno gástrico, completando de ese modo la presente solicitud.

TÉCNICAS ANTERIORES

DOCUMENTOS NO DE PATENTES

(Documento no de patente 1) Law G. (2000) Threonine requirement and the effect of threonine on gut mucin characteristics in piglets receiving intragastric nutrition. Tesis de maestría de la Universidad de Alberta. 1-143.

(Documento no de patente 2) Miyamoto T., Okono S. and Kasai N (2009)

Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft hydrothermal processing. Applied and Environmental Microbiology, 75(15), 5058-5063.

(Documento no de patente 3) Lee I.H. (2018) Latest trend surrounding animal antimicrobial agents and alternatives. Pig & Consulting, 4, 70-73.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

PROBLEMA TÉCNICO

La presente solicitud proporciona una composición para pienso para la prevención o mejora de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina.

La presente solicitud proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina.

La presente solicitud proporciona una composición alimenticia para la prevención o mejora de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina.

La presente solicitud proporciona una composición antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina.

SOLUCIÓN TÉCNICA

Un aspecto puede proporcionar una composición para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina.

En la presente solicitud, “prevención” puede significar todas las acciones que inhiben o retardan la aparición de una enfermedad mediante la administración de la composición según un ejemplo, y “tratamiento” puede significar todas las acciones en

las que los síntomas de sujetos que se sospecha que tienen y con aparición de una enfermedad se mejoran o cambian de manera beneficiosa mediante la administración de la composición según un ejemplo, y “mejora” puede significar todas las acciones que al menos reducen los parámetros relacionados con el estado en el que se trata la enfermedad, por ejemplo, la gravedad de síntomas, mediante la administración de la composición según un ejemplo. La enfermedad puede significar un trastorno gástrico.

Un aspecto puede proporcionar una composición para pienso para la prevención o mejora de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina.

En la presente solicitud, “cepa de *Corynebacterium* sp. (*Coryne* sp.)” puede comprender todas las cepas de *Corynebacterium* sp. La cepa de *Corynebacterium* sp. puede ser, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium crudilactis*, *Corynebacterium deserti*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium stationis*, *Corynebacterium singulare*, *Corynebacterium halotolerans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium pollutisoli*, *Corynebacterium imitans*, *Corynebacterium testudinoris* y/o *Corynebacterium flavescens*, y más específicamente, puede ser *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes* o una combinación de las mismas (*Corynebacterium glutamicum* y *Corynebacterium ammoniagenes*).

En un ejemplo, la cepa de *Corynebacterium* sp. puede tener la productividad de treonina. En la presente solicitud, tener la productividad de treonina significa mostrar la capacidad de producir y acumular treonina en el microorganismo y/o el medio cuando el microorganismo correspondiente se cultiva en un medio.

Cuando la composición para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico según un ejemplo comprende *Corynebacterium glutamicum*, (i) un efecto de prevención, mejora o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) una eficacia anti-*Helicobacter pylori* puede(n) ser excelente(s) con respecto a una composición que comprende cualquier otra clase de cepas de *Corynebacterium* sp. distintas de *Corynebacterium glutamicum* (por ejemplo, *Corynebacterium efficiens*).

Cuando la composición para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico según un ejemplo comprende *Corynebacterium ammoniagenes*, (i) un

efecto de prevención, mejora o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) una eficacia anti-*Helicobacter pylori* puede(n) ser excelente(s) con respecto a una composición que comprende cualquier otra clase de cepas de *Corynebacterium* sp. distintas de *Corynebacterium ammoniagenes* (por ejemplo, *Corynebacterium efficiens*).

Cuando la composición para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico según un ejemplo comprende *Corynebacterium glutamicum* y *Corynebacterium ammoniagenes*, (i) un efecto de prevención, mejora o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) una eficacia anti-*Helicobacter pylori* puede(n) ser excelente(s) con respecto a una composición que comprende cualquier otra clase de cepas de *Corynebacterium* sp. distintas de *Corynebacterium glutamicum* y *Corynebacterium ammoniagenes* (por ejemplo, *Corynebacterium efficiens*).

En un ejemplo, la excelente eficacia anti-*Helicobacter pylori* de la composición puede significar que la actividad antimicrobiana contra la cepa de *Helicobacter pylori* es excelente o que la actividad de prevención de la apoptosis de células (por ejemplo, células de la mucosa gástrica) infectadas por *Helicobacter pylori* es excelente.

La cepa de *Corynebacterium* sp. puede significar una célula microbiana concentrada en la que un medio de cultivo se retira en la disolución cultivada, y puede hacerse pasar a través de un procedimiento de centrifugación y/o filtración para recuperar únicamente las células microbianas concentradas a partir del producto cultivado.

En un ejemplo, la cepa de *Corynebacterium* sp. puede estar comprendida en forma de bacterias termoinactivadas. En la presente solicitud, “bacterias termoinactivadas” es un concepto opuesto a bacterias viables, que significa una forma en la que se previene el crecimiento de bacterias mediante el tratamiento térmico de bacterias viables y metabolitos obtenidos a través de fermentación, y similares. Las bacterias termoinactivadas pueden comprender sustancias antimicrobianas tales como citoplasma, pared celular, bacteriocina y similares, polisacáridos y/o ácidos orgánicos, y similares.

La composición que comprende una bacteria termoinactivada según un ejemplo puede tener al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en los siguientes puntos (1) a (6) con respecto a la composición que comprende una célula

viable.

- (1) Excelente resistencia al ácido;
- (2) Excelente resistencia al calor;
- (2) Posibilidad de concentración a una alta concentración;
- (4) Excelente estabilidad;
- (5) Fácil manipulación y almacenamiento; y
- (6) Posibilidad de usarse como alimentación de bacterias intestinales beneficiosas.

La cepa de *Corynebacterium* sp. puede inactivarse mediante tratamiento de Tyndall y/o térmico. En un ejemplo, la disolución cultivada que esteriliza la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado comprende una bacteria termoinactivada de la cepa. Por ejemplo, el tratamiento térmico puede avanzar a una temperatura de 60 a 130°C durante de 3 a 30 minutos. Además, el tratamiento térmico puede avanzar mediante esterilización a ultraalta temperatura, esterilización en autoclave y/o secado con aire caliente de una a 10 veces. La esterilización a ultraalta temperatura puede avanzar a una temperatura de 110°C a 130°C durante de 3,0 a 10,0 segundos, y por ejemplo, puede avanzar a 100°C durante de 1,0 segundo a 10 segundos dos veces, y a 121°C durante de 1,0 a 10,0 segundos una vez, y la esterilización en autoclave puede realizarse a de 120 a 125°C, o a 121°C durante de 10 minutos a 30 minutos, de 15 minutos a 25 minutos, o 20 minutos, y el secado con aire caliente puede realizarse a una temperatura de 60 a 70°C.

En un ejemplo específico, se confirmó que la composición que comprende una bacteria termoinactivada de la cepa de *Corynebacterium* sp., producto cultivado de la cepa de *Corynebacterium* sp. y treonina tiene (i) efecto de prevención o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) eficacia anti-*Helicobacter pylori* excelentes *in vitro* y/o *in vivo*.

La composición según un ejemplo puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp. (o bacterias termoinactivadas de la cepa) en una concentración de DO de 20 a 40 (longitud de onda de 560 a 565 nm), DO de 25 a 35 (longitud de onda de 560 a 565 nm) o DO de 30 (longitud de onda de 560 a 565 nm).

La composición según un ejemplo puede comprender de 1 a 100 g/l, de 5 a 100

g/l, de 10 a 100 g/l, de 15 a 100 g/l, de 20 a 100 g/l, de 21 a 100 g/l, de 1 a 80 g/l, de 5 a 80 g/l, de 10 a 80 g/l, de 15 a 80 g/l, de 20 a 80 g/l, de 21 a 80 g/l, de 1 a 60 g/l, de 5 a 60 g/l, de 10 a 60 g/l, de 15 a 60 g/l, de 20 a 60 g/l, de 21 a 60 g/l, de 1 a 50 g/l, de 5 a 50 g/l, de 10 a 50 g/l, de 15 a 50 g/l, de 20 a 50 g/l, de 21 a 50 g/l, de 1 a 30 g/l, de 5 a 30 g/l, de 10 a 30 g/l, de 15 a 30 g/l, de 20 a 30 g/l, de 21 a 30 g/l, de 1 a 25 g/l, de 5 a 25 g/l, de 10 a 25 g/l, de 15 a 25 g/l, de 20 a 25 g/l o de 21 a 25 g/l de la cepa de *Corynebacterium* sp. (o bacterias termoinactivadas de la cepa) en una concentración de DO de 20 a 40 (longitud de onda de 560 a 565 nm), DO de 25 a 35 (longitud de onda de 560 a 565 nm) o DO de 30 (longitud de onda de 560 a 565 nm).

La composición según un ejemplo puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp. (o bacterias termoinactivadas de la cepa) en una concentración de 1 a 100 g/l, de 5 a 100 g/l, de 10 a 100 g/l, de 15 a 100 g/l, de 20 a 100 g/l, de 21 a 100 g/l, de 1 a 80 g/l, de 5 a 80 g/l, de 10 a 80 g/l, de 15 a 80 g/l, de 20 a 80 g/l, de 21 a 80 g/l, de 1 a 60 g/l, de 5 a 60 g/l, de 10 a 60 g/l, de 15 a 60 g/l, de 20 a 60 g/l, de 21 a 60 g/l, de 1 a 50 g/l, de 5 a 50 g/l, de 10 a 50 g/l, de 15 a 50 g/l, de 20 a 50 g/l, de 21 a 50 g/l, de 1 a 30 g/l, de 5 a 30 g/l, de 10 a 30 g/l, de 15 a 30 g/l, de 20 a 30 g/l, de 21 a 30 g/l, de 1 a 25 g/l, de 5 a 25 g/l, de 10 a 25 g/l, de 15 a 25 g/l, de 20 a 25 g/l o de 21 a 25 g/l.

La composición según un ejemplo puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp. (o bacterias termoinactivadas de la cepa) en una cantidad del 0,1 al 10% en peso, del 0,1 al 8% en peso, del 0,1 al 5% en peso, del 0,1 al 4% en peso, del 0,1 al 3,5% en peso, del 0,1 al 3% en peso, del 0,1 al 1% en peso, del 1 al 10% en peso, del 1 al 8% en peso, del 1 al 5% en peso, del 1 al 4% en peso, del 1 al 3,5% en peso, del 1 al 3% en peso, del 2 al 10% en peso, del 2 al 8% en peso, del 2 al 5% en peso, del 2 al 4% en peso, del 2 al 3,5% en peso, del 2 al 3% en peso, del 3 al 10% en peso, del 3 al 8% en peso, del 3 al 5% en peso, del 3 al 4% en peso, del 3 al 3,5% en peso, del 3,5 al 10% en peso, del 3,5 al 8% en peso, del 3,5 al 5% en peso o del 3,5 al 4% en peso.

En un ejemplo, la cepa de *Corynebacterium* sp. puede estar comprendida en el producto cultivado de la cepa.

El “producto cultivado” significa productos obtenidos después de cultivar la cepa de *Corynebacterium* sp., y puede comprender productos fermentados. En un ejemplo, el

producto cultivado puede ser productos fermentados en los que la cepa de *Corynebacterium* sp. se cultiva en un medio. Los “productos fermentados” significan productos de descomposición enzimática o metabólica de sustancias orgánicas usando un microorganismo. En la presente solicitud, “fermentación” puede significar todas las actividades o procesos que incluyen descomposición enzimática o metabólica de sustancias orgánicas usando un microorganismo, excepto la reacción de corrupción.

El producto cultivado (o producto fermentado) puede ser el producto cultivado total de la cepa de *Corynebacterium* sp., su disolución diluida, concentrado, materia seca, liofilizado, lisado y/o fracción, y similares, y el concentrado puede obtenerse centrifugando o evaporando el producto cultivado, y la materia seca puede obtenerse secando el producto cultivado usando una secadora, y similares, y el liofilizado puede obtenerse liofilizando el producto cultivado usando un liofilizador, y similares, y el lisado puede obtenerse tratando físicamente o por ultrasonidos la cepa o el producto cultivado, y la fracción puede obtenerse aplicando el producto cultivado, el lisado y similares al método de centrifugación, cromatografía y similares.

El producto cultivado o producto fermentado puede estar en fase sólida (sólido, por ejemplo, materia seca), fase líquida (líquido) o lecho fluidizado, pero sin limitarse a los mismos.

En un ejemplo, el producto cultivado puede significar todos los medios que comprenden una cepa cultivada, su metabolito y/o nutriente residual, y similares, obtenidos cultivando la cepa de *Corynebacterium* sp. durante un determinado periodo.

En un ejemplo, el producto cultivado puede significar otros componentes excepto la cepa (célula microbiana) y/o treonina en el producto fermentado en el que la cepa de *Corynebacterium* sp. se cultiva en un medio.

En un ejemplo, el producto cultivado puede ser uno en el que la cepa de *Corynebacterium* sp. se retira o no se retira.

En un ejemplo, el producto cultivado puede ser una disolución cultivada (o producto cultivado) en la que la cepa se retira a partir de la disolución cultivada en la que la cepa de *Corynebacterium* sp. se cultiva en un medio. La disolución cultivada (o producto cultivado) en la que la cepa se retira puede ser una disolución cultivada (o

producto cultivado) libre de células o una disolución cultivada que comprende una bacteria termoinactivada, y por ejemplo, puede ser un filtrado en el que la cepa se retira mediante centrifugación (sobrenadante centrifugado) y filtración y/o una disolución cultivada (o materia seca de la disolución cultivada) que comprende una bacteria termoinactivada.

La composición según un ejemplo puede comprender el producto cultivado (o producto fermentado) en una cantidad del 1 al 80% en peso, del 5 al 80% en peso, del 10 al 80% en peso, del 15 al 80% en peso, del 20 al 80% en peso, del 23 al 80% en peso, del 25 al 80% en peso, del 1 al 60% en peso, del 5 al 60% en peso, del 10 al 60% en peso, del 15 al 60% en peso, del 20 al 60% en peso, del 23 al 60% en peso, del 25 al 60% en peso, del 1 al 50% en peso, del 5 al 50% en peso, del 10 al 50% en peso, del 15 al 50% en peso, del 20 al 50% en peso, del 23 al 50% en peso, del 25 al 50% en peso, del 1 al 40% en peso, del 5 al 40% en peso, del 10 al 40% en peso, del 15 al 40% en peso, del 20 al 40% en peso, del 23 al 40% en peso, del 25 al 40% en peso, del 1 al 30% en peso, del 5 al 30% en peso, del 10 al 30% en peso, del 15 al 30% en peso, del 20 al 30% en peso, del 23 al 30% en peso, del 25 al 30% en peso, del 1 al 25% en peso, del 5 al 25% en peso, del 10 al 25% en peso, del 15 al 25% en peso, del 20 al 25% en peso o del 23 al 25% en peso. Según un ejemplo, la composición que comprende el producto cultivado en el intervalo anterior puede tener (i) efecto de prevención o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) eficacia anti-*Helicobacter pylori* excelentes con respecto a la composición que comprende el producto cultivado con un contenido fuera del intervalo anterior.

El producto cultivado puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp., y puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp. en el producto cultivado con un contenido del 0,1 al 10% en peso, del 0,1 al 8% en peso, del 0,1 al 5% en peso, del 0,1 al 4% en peso, del 0,1 al 3,5% en peso, del 0,1 al 3% en peso, del 0,1 al 1% en peso, del 1 al 10% en peso, del 1 al 8% en peso, del 1 al 5% en peso, del 1 al 4% en peso, del 1 al 3,5% en peso, del 1 al 3% en peso, del 2 al 10% en peso, del 2 al 8% en peso, del 2 al 5% en peso, del 2 al 4% en peso, del 2 al 3,5% en peso, del 2 al 3% en peso, del 3 al 10% en peso, del 3 al 8% en peso, del 3 al 5% en peso, del 3 al 4% en peso, del 3 al 3,5% en peso, del 3,5 al 10% en peso, del 3,5 al 8% en peso, del 3,5 al 5% en peso o del 3,5 al 4% en peso.

En un ejemplo, la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado puede

ser un producto cultivado que comprende una bacteria termoinactivada de la cepa de *Corynebacterium* sp. obtenida mediante tratamiento térmico (o esterilización (por ejemplo, esterilización en autoclave o secado con aire caliente)) el producto cultivado preparado cultivando la cepa de *Corynebacterium* sp. en un medio durante un determinado periodo.

En la presente solicitud, “cultivo” significa una serie de acciones de crecimiento y desarrollo de un microorganismo bajo la condición ambiental ajustada de manera artificial y apropiada. El cultivo puede usar cualquier condición de cultivo y método de cultivo conocidos en la técnica. Por ejemplo, el cultivo puede realizarse de manera continua en el método de cultivo discontinuo, método de cultivo continuo, método de cultivo semicontinuo, procedimiento discontinuo o procedimiento semicontinuo o semicontinuo repetido conocido. Entonces, la condición de cultivo puede ajustarse a un pH apropiado (por ejemplo, pH 5 a 9, pH 6 a 8, o pH 6,8) usando un compuesto básico (por ejemplo: hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco) o un compuesto ácido (por ejemplo: ácido fosfórico o ácido sulfúrico), pero sin limitarse a los mismos. En un ejemplo, puede inhibirse la formación de burbujas usando un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso y/o puede mantenerse una condición aerobia introduciendo oxígeno o una mezcla de gases que contiene oxígeno al producto cultivado.

En un ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser de 20 a 45°C, de 25 a 40°C, de 30 a 40°C, de 30 a 35°C o de 35 a 40°C, y la condición de cultivo puede ser de 100 a 500 rpm, de 150 a 300 rpm, de 150 a 250 rpm o de 200 rpm, y el tiempo (periodo) de cultivo puede ser de 1 a 160 horas, de 10 a 100 horas, de 12 a 72 horas, de 24 a 72 horas, de 30 a 60 horas, de 40 a 50 horas, de 45 a 50 horas o de 48 horas. El periodo de cultivo puede continuarse hasta que se obtiene una sustancia beneficiosa (por ejemplo, L-treonina, treonina) en un rendimiento deseado. En un ejemplo, el cultivo puede realizarse a la temperatura de cultivo en el intervalo anterior durante el tiempo de cultivo en el intervalo anterior.

Un medio usado para el cultivo debe satisfacer las condiciones de una cepa específica de un modo apropiado, y los expertos en la técnica pueden usarlo de manera adecuada según el contenido conocido. Según un ejemplo, para el medio para cultivar la cepa de *Corynebacterium* sp. puede hacerse referencia a bibliografías conocidas (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology.

Washington D.C., EE.UU., 1981), pero sin limitarse a las mismas.

Para cultivar la cepa de *Corynebacterium* sp., pueden satisfacerse los requisitos de supervivencia de una cepa específica de un modo apropiado ajustando la temperatura, el pH y similares, en condiciones anaerobias en un medio habitual que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y similares apropiados. Como fuente de carbono que va a usarse en el medio, pueden usarse por separado o usarse en combinación sacárido e hidrato de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa), aceite y grasa (por ejemplo, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco), ácido graso (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico), alcohol (por ejemplo, glicerol y etanol) y ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético), y similares, pero sin limitarse a los mismos. Como fuente de nitrógeno, pueden usarse por separado o usarse en combinación un compuesto orgánico que contiene nitrógeno (por ejemplo: peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de fermentación del maíz, harina de soja y urea) o compuesto inorgánico (por ejemplo: sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio), y similares, pero sin limitarse a los mismos. Como fuente de fosfato, pueden usarse por separado o usarse en combinación dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, sal que contiene nitrógeno correspondiente a los mismos, y similares, pero sin limitarse a los mismos. Además, el medio de cultivo puede contener otras sales metálicas (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro) requeridas para el crecimiento y/o comprender sustancias esenciales para el crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas, pero sin limitarse a los mismos.

En un ejemplo, el medio puede ser un medio para producir treonina (por ejemplo, medio n.º 435), y la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado puede ser un producto cultivado en el que la cepa de *Corynebacterium* sp. se cultiva en el medio para producir treonina, y la treonina puede liberarse al medio de cultivo o estar comprendida en una célula.

En un ejemplo, la cepa de *Corynebacterium* sp. y/o su producto cultivado (la cepa de *Corynebacterium* sp.) puede comprender treonina.

En un ejemplo, la cepa de *Corynebacterium* sp. y/o su producto cultivado pueden no comprender treonina.

En la presente solicitud, “treonina (Thr)” es un hidroxí- α -aminoácido y es uno de los aminoácidos esenciales que no se producen en el organismo, es decir, el aminoácido que tiene la fórmula química de $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$. La treonina puede ser un isómero óptico de tipo L (treonina de tipo L (L-treonina, L-Thr)), de tipo D o su combinación. La treonina es un aminoácido esencial, y consiste en mucina, una sustancia protectora para el epitelio intestinal, y cuando es insuficiente, puede provocar la detención del crecimiento y adelgazamiento.

Según un ejemplo, cuando se mezclan la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y/o treonina, puede(n) mostrarse (i) efecto de prevención o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) eficacia anti-*Helicobacter pylori* sinérgicamente excelente(s).

La composición según un ejemplo puede comprender treonina del 50 al 90% en peso, del 50 al 85% en peso, del 50 al 80% en peso, del 50 al 75% en peso, del 50 al 70% en peso, del 55 al 90% en peso, del 55 al 85% en peso, del 55 al 80% en peso, del 55 al 75% en peso, del 55 al 70% en peso, del 60 al 90% en peso, del 60 al 85% en peso, del 60 al 80% en peso, del 60 al 75% en peso, del 60 al 70% en peso, del 65 al 90% en peso, del 65 al 85% en peso, del 65 al 80% en peso, del 65 al 75% en peso, del 65 al 70% en peso, del 70 al 90% en peso, del 70 al 85% en peso, del 70 al 80% en peso, del 70 al 75% en peso o del 70% en peso. La composición que comprende treonina en el intervalo anterior puede tener (i) efecto de prevención o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) eficacia anti-*Helicobacter pylori* excelentes con respecto a la composición que comprende treonina con un contenido fuera del intervalo anterior.

La treonina puede estar comercialmente disponible o producirse usando un método de extracción, un método de fermentación, un método enzimático y/o un método de síntesis, y similares. Por ejemplo, puede obtenerse obteniendo un producto fermentado que comprende treonina usando una cepa del tipo *Coryne* y después purificándolo, o sintetizarse a través de una ruta de biosíntesis de treonina, y/o sintetizarse químicamente.

La treonina puede (1) estar comprendida en la cepa de *Corynebacterium* sp. y/o su producto cultivado, o (2) estar comprendida adicionalmente en una forma que no esté comprendida en la cepa de *Corynebacterium* sp. y/o su producto cultivado, o (3) su combinación (por ejemplo, la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado

comprendidos en la composición comprenden treonina y, además, comprenden adicionalmente treonina), en la composición según un ejemplo.

La treonina comprendida en la composición según un ejemplo puede

(1) estar comprendida en la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado, o ambos de ellos (cepa y producto cultivado); o

(2) añadirse por separado; o

(3) estar comprendida en la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado, o ambos de ellos (cepa y producto cultivado) y añadirse adicionalmente (por separado) a los mismos.

Que la treonina se añade por separado puede significar añadir adicionalmente treonina purificada además de la treonina comprendida en la cepa y/o producto cultivado.

La treonina puede estar en forma de polvo y/o gránulos. La treonina de tipo gránulos puede tener un tamaño de partícula de 100 a 1000 μm o de 200 a 1000 μm .

La composición según un ejemplo puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp. de 0,1 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 10 a 90 partes en peso y la treonina de 10 a 80 partes en peso. Específicamente, pueden estar comprendidos la cepa de 0,2 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 12 a 88 partes en peso y la treonina de 10,5 a 78 partes en peso, la cepa de 0,3 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 13 a 87 partes en peso y la treonina de 11 a 77 partes en peso, la cepa de 0,4 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 14 a 86 partes en peso y la treonina de 11,5 a 76 partes en peso, la cepa de 0,5 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 15 a 85 partes en peso y la treonina de 12 a 75 partes en peso, la cepa de 0,6 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 16 a 84 partes en peso y la treonina de 12,5 a 74 partes en peso, la cepa de 0,7 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 17 a 83 partes en peso y la treonina de 13 a 73 partes en peso, la cepa de 0,8 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 18 a 82 partes en peso y la treonina de 13,5 a 72 partes en peso, la cepa de 0,9 a 5 partes en peso, el producto cultivado de 19 a 81 partes en peso y la treonina de 14 a 71 partes en peso, la cepa de 0,9 a 4 partes en peso, el producto cultivado de 20 a 80 partes en peso y la treonina de 14 a 70 partes en peso, la cepa de 1 a 4 partes en peso, el producto cultivado de 21 a 79 partes en peso y la treonina de 14 a 69 partes en peso, o la cepa de 1 a 3 partes en peso, el producto

cultivado de 22 a 78 partes en peso y la treonina de 14 a 68 partes en peso.

En la composición según un ejemplo, la razón en peso de la cepa y su producto cultivado y treonina (peso de la cepa y su producto cultivado:peso de treonina) puede ser de 1:0,1 a 1:10, de 1:0,1 a 1:5, de 1:0,1 a 1:3, de 1:0,2 a 1:10, de 1:0,2 a 1:5, de 1:0,2 a 1:3, de 1:0,5 a 1:10, de 1:0,5 a 1:5, de 1:0,5 a 1:3, de 1:1 a 1:10, de 1:1 a 1:5, de 1:1 a 1:3, de 1:3 a 1:10, de 1:3 a 1:5, o de 1:3.

La composición según un ejemplo puede comprender además lignosulfonato. Cuando la composición según un ejemplo comprende además lignosulfonato, (i) el efecto de prevención o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) la eficacia anti-*Helicobacter pylori* pueden resultar excelentes.

La composición según un ejemplo puede comprender además lignosulfonato de calcio para ajustar el contenido de treonina. Según un ejemplo, la composición puede comprender lignosulfonato de calcio del 0,1 al 50% en peso, del 0,1 al 30% en peso, del 0,1 al 25% en peso, del 0,1 al 20% en peso, del 0,1 al 15% en peso, del 0,1 al 10% en peso, del 0,1 al 7% en peso, del 1 al 50% en peso, del 1 al 30% en peso, del 1 al 25% en peso, del 1 al 20% en peso, del 1 al 15% en peso, del 1 al 10% en peso, del 1 al 7% en peso, del 3 al 50% en peso, del 3 al 30% en peso, del 3 al 25% en peso, del 3 al 20% en peso, del 3 al 15% en peso, del 3 al 10% en peso, del 3 al 7% en peso, del 5 al 50% en peso, del 5 al 30% en peso, del 5 al 25% en peso, del 5 al 20% en peso, del 5 al 15% en peso, del 5 al 10% en peso, del 5 al 7% en peso, del 6,5 al 50% en peso, del 6,5 al 30% en peso, del 6,5 al 25% en peso, del 6,5 al 20% en peso, del 6,5 al 15% en peso, del 6,5 al 10% en peso o del 6,5 al 7% en peso. En un ejemplo, la composición puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado en forma seca (por ejemplo, materia seca de 'cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado'). La materia seca puede prepararse secando la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado, y la materia seca puede comprender treonina. En un ejemplo, el secado puede realizarse mediante al menos un método seleccionado del grupo que consiste en secado a vacío, secado con aire caliente, liofilización, secado con aire ambiental, secado en película delgada y/o secado a vacío.

En un ejemplo, la composición puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina en forma seca (por ejemplo, materia seca de 'cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado' que comprende treonina).

La formulación de la composición según un ejemplo puede estar en forma de emulsión, suspensión o disolución en aceite o medios acuosos, o en forma de extracto, polvo, gránulo, comprimido, cápsula o gel (por ejemplo, hidrogel), y puede comprender además un agente dispersante o agente estabilizante.

La composición según un ejemplo específico puede prepararse secando la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado (producto fermentado), y pueden estar comprendidos en esta composición treonina, la cepa de *Corynebacterium* sp. (por ejemplo, cepa en una bacteria termoinactivada) y un componente del producto cultivado distinto de la treonina y cepa. En un ejemplo, la composición según un ejemplo que se prepara secando la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado puede estar en forma de gránulo, y esta puede tener (i) efecto de prevención o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) eficacia anti-*Helicobacter pylori* excelentes con respecto a la treonina purificada en forma de polvo.

En la presente solicitud, “gránulo” significa un estado en el que se agrega polvo para formar una partícula 30~150 veces más grande, y “granulación” puede significar inducir que una materia prima se convierta en un gránulo mediante tratamiento con un procedimiento, y similares. En un ejemplo, en el procedimiento de secar la composición que comprende la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y/o treonina, la composición puede mostrar forma de gránulo.

En un ejemplo, el trastorno gástrico puede estar provocado por infección por *Helicobacter pylori*.

En un ejemplo, el trastorno gástrico puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal, úlcera péptica y cáncer gástrico.

La gastritis significa un estado en el que se provoca inflamación de la pared interna gástrica, y puede producirse la úlcera gástrica a medida que se rompe el equilibrio de factores de ataque que provocan daño a la mucosa y factores de defensa que protegen a la mucosa en el estómago y el intestino. Los factores de ataque que pueden considerarse como causas de úlcera gástrica incluyen ácido gástrico, diversas clases de enzimas digestivas, bilis, fármacos ingeridos, alcohol, infección por *Helicobacter pylori*, ingesta de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, fumar y

similares.

Cuando la composición según un ejemplo se usa como una composición para pienso, puede prepararse una composición para pienso en una forma en la que la composición según un ejemplo se añade a una composición para pienso comercialmente disponible. El pienso en el que puede usarse la composición según un ejemplo es preferiblemente una formulación de polvo o microgránulos, o una formulación líquida, pero sin limitarse a las mismas. Además, la cantidad añadida de la composición de la presente solicitud que se añade al pienso no requiere ninguna limitación particular.

En la presente solicitud, “pienso” puede significar cualquier dieta, comida y similar recomendada natural o artificial, o un componente de la comida, para que los animales lo coman, digieran o que sea adecuado para los mismos.

La clase del pienso no está particularmente limitada, y pueden usarse piensos habitualmente usados en la técnica. Un ejemplo no limitativo del pienso puede incluir piensos de origen vegetal tales como cereales, raíces, subproductos del procesamiento de alimentos, algas, fibra, subproductos farmacéuticos, grasas y aceites, almidones, cáscaras o subproductos de cereales, o similares; y piensos de origen animal tales como proteínas, compuestos inorgánicos, grasas y aceites, minerales, grasas y aceites, proteínas unicelulares, alimento o plancton de origen animal, o similares. Pueden usarse solos o en combinación de dos o más.

El sujeto (animal) al que puede suministrársele el pienso que comprende la composición según un ejemplo no está particularmente limitado, pero puede ser mamíferos, peces, crustáceos y/o moluscos, y por ejemplo, puede ser un cerdo, vaca, caballo, cabra, ciervo, oveja, gallina, pato, ganso, pavo, perro, gato, conejo o pez.

La composición para pienso puede comprender además un excipiente, un diluyente o un aditivo. La composición para pienso puede comprender un componente eficaz para fomentar el crecimiento de animales, un componente nutritivo, un suplemento nutritivo, un componente que mejora la estabilidad de conservación, un componente de material de recubrimiento, una preparación de aminoácidos para prevenir una enfermedad, una preparación de vitaminas, una preparación de enzimas, un compuesto nitrogenado distinto de proteína, una preparación de silicato, un tampón,

un disolvente de extracción, un probiótico; enzimas tales como amilasa, lipasa y similares; vitaminas tales como ácido L-ascórbico, cloruro de colina, inositol y similares; minerales tales como cloruro de potasio, citrato de hierro, óxido de magnesio, fosfatos y similares; aminoácidos tales como lisina, alanina, metionina y similares; ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido butírico, ácido láctico y similares o sales de los mismos; antioxidantes tales como vitamina C, vitamina E y similares, agentes de inhibición de mohos tales como propionato de calcio y similares; emulsionantes tales como lecitina, éster de ácido graso de glicerina y similares; y/o pigmentos, y similares, además de los componentes. Aunque no se describió anteriormente, la composición para pienso según un ejemplo puede comprender además otros nutrientes dentro de un intervalo que pueden esperar los expertos en la técnica.

Otro aspecto puede proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina. La cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado, treonina y/o el trastorno gástrico comprendidos en la composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento según un ejemplo son tal como se describen para la composición para pienso para la prevención o mejora de un trastorno gástrico.

La composición farmacéutica según un ejemplo puede comprender además un portador, excipiente o diluyente apropiado habitualmente usado para la preparación de composiciones farmacéuticas. Específicamente, la composición farmacéutica puede usarse formulándose en forma de formulaciones orales tales como polvo, gránulo, comprimido, cápsula, suspensión, emulsión, jarabe, aerosol y similares, aplicaciones externas, supositorios y disolución para inyección esterilizada, según cada método habitual. El portador, excipiente y diluyente que va a estar comprendido en la composición farmacéutica puede incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Cuando se formula, se prepara usando un diluyente o excipiente tal como carga, extensor, aglutinante, agente humectante, agente disgregante, tensioactivo y similares. Las formulaciones sólidas para administración oral incluyen comprimido, pastilla, polvo, gránulo, cápsula y similares, y estas formulaciones sólidas se preparan mezclando al menos un excipiente, por ejemplo, almidón, carbonato

de calcio, sacarosa o lactosa, gelatina y similares, con la composición. Además, además del excipiente simple, un lubricante tal como estearato de magnesio y talco. Las formulaciones líquidas para administración oral incluyen suspensión, líquido oral, emulsión, jarabe y similares, y además de diluyentes simples habitualmente usados, pueden estar comprendidos agua y parafina líquida, diversos excipientes, por ejemplo, agente humectante, edulcorante, aromatizante, conservante y similares. Las formulaciones para administración parenteral incluyen disolución acuosa esterilizada, disolvente no acuoso, suspensión, emulsión, formulación secada por congelación y supositorios. Como disolvente no acuoso y suspensión, pueden usarse propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, éster inyectable tal como oleato de etilo, y similares. Como compuesto base de supositorios, pueden usarse Witepsol, Macrogol, Tween 61, manteca de cacao, laurinum, gelatina de glicerol, y similares.

La composición farmacéutica según un ejemplo puede administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz, y en la presente solicitud, “cantidad farmacéuticamente eficaz” significa una cantidad suficiente para tratar o prevenir una enfermedad, a una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable para el tratamiento o la prevención médicos, y el nivel de dosis eficaz puede determinarse según factores que incluyen gravedad de la enfermedad, actividad farmacológica, edad del paciente, peso corporal, salud, género, sensibilidad del paciente a los fármacos, momento de administración, vía de administración y tasa de descarga de la composición de la presente solicitud usada, periodo de tratamiento, fármacos usados en combinación o concurrentemente con la composición de la presente solicitud usada, y otros factores conocidos en el campo médico. La composición farmacéutica según un ejemplo puede administrarse como agente terapéutico independiente, o administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, y puede administrarse secuencial o simultáneamente con un agente terapéutico convencional. Además, puede administrarse de manera individual o múltiple. Es importante administrar una cantidad que pueda obtener el efecto máximo en una cantidad mínima sin efectos secundarios, considerando todos los factores.

La dosificación de la composición farmacéutica según un ejemplo puede ser de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, específicamente, de 0,001 a 10 mg/kg, para un mamífero al día. La frecuencia de administración de la composición farmacéutica de la presente solicitud puede administrarse una vez al día o administrarse varias veces dividiendo la dosificación, pero sin limitarse particularmente a las mismas. La

dosificación no limita el alcance de la presente solicitud en ningún aspecto.

La composición farmacéutica según un ejemplo no está limitada en cuanto al método de administración siempre que pueda llegar al tejido diana. Por ejemplo, se incluye inyección intraarticular, administración oral, inyección intraarterial, inyección intravenosa o inyección percutánea, o similares. Además, la composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier dispositivo que pueda transportar un principio activo a una célula diana.

Otro aspecto puede proporcionar una composición alimenticia para la prevención o mejora de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina. La cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado, treonina y/o el trastorno gástrico comprendidos en la composición alimenticia para la prevención o mejora de un trastorno gástrico son tal como se describen para la composición para pienso para la prevención o mejora de un trastorno gástrico.

El alimento incluye carne, salchicha, pan, chocolate, caramelo, tentempié, dulce, pizza, ramen, otros fideos, gominola, productos lácteos incluyendo helado, diversas clases de sopa, bebida, té, líquido bebible, bebida alcohólica, complejo vitamínico, alimento funcional para la salud y alimento saludable, y similares, e incluyen todos los alimentos en el significado habitual.

El alimento funcional para la salud es un término sinónimo de alimento para uso específico en salud (FoSHU), y significa alimento con grandes efectos medicinales y médicos, que se procesa para mostrar eficazmente la función de modulación corporal además de suministro nutricional. En el presente documento, “función/funcional” significa obtener un efecto útil sobre un uso saludable, tal como ajustar los nutrientes o efectos fisiológicos sobre la estructura y función del cuerpo humano. El alimento de la presente solicitud puede prepararse mediante un método habitualmente usado en la técnica, y cuando se prepara, puede prepararse añadiendo una materia prima y un componente habitualmente añadido. Además, la formulación de alimento puede prepararse sin limitación siempre que se formule de manera admitida como alimento. La composición para alimento de la presente solicitud puede prepararse en diversas formas de formulaciones y diferentes de fármacos generales, tiene la ventaja de no provocar los efectos secundarios que pueden producirse al tomar fármacos durante un

largo periodo y tiene una excelente portabilidad, y por tanto, el alimento de la presente invención puede tomarse como suplemento para potenciar la prevención o mejora de úlcera gástrica.

El alimento saludable significa alimento que tiene un efecto de mantenimiento o potenciación de salud activo en comparación con un alimento general, y el alimento de suplemento para la salud significa alimento con fines de suplemento para la salud. En algunos casos, los términos de alimento funcional para la salud, alimento saludable y alimento de suplemento para la salud pueden usarse de manera intercambiable.

Específicamente, el alimento funcional para la salud es un alimento en el que la composición según un ejemplo se añade a materiales alimenticios tales como bebida, té, especia, gominola, dulce y similares, o un alimento preparado como cápsula, polvo, suspensión y similares, y significa que tiene un determinado efecto sobre la salud cuando se ingiere, pero a diferencia de los fármacos generales, tiene la ventaja de que no provoca ningún efecto secundario que puede producirse al tomar fármacos durante un largo periodo al usar el alimento como materia prima.

Es posible que la composición alimenticia según un ejemplo se ingiera diariamente y, por tanto, puede esperarse un gran efecto para la prevención o mejora de un trastorno gástrico, y por tanto puede usarse de manera muy útil.

La composición alimenticia puede comprender además un portador fisiológicamente aceptable, y la clase del portador no está particularmente limitada, y puede usarse cualquier portador habitualmente usado en la técnica.

Además, la composición alimenticia puede comprender un componente adicional que puede mejorar el olor, sabor, aspecto y similares, que se usa habitualmente en la composición alimenticia. Por ejemplo, pueden estar comprendidos las vitaminas A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, niacina, biotina, folato, ácido pantoténico y similares. Además, pueden estar comprendidos minerales tales como zinc (Zn), hierro (Fe), calcio (Ca), cromo (Cr), magnesio (Mg), manganeso (Mn), cobre (Cu), cromo (Cr) y similares. Además, pueden estar comprendidos aminoácidos tales como lisina, triptófano, cisteína, valina y similares.

Además, la composición alimenticia puede comprender aditivos alimentarios

tales como conservante (sorbato de potasio, benzoato de sodio, ácido salicílico, ácido deshidroacético de sodio, etc.), desinfectante (polvo blanqueante y polvo blanqueante superior, hipoclorito de sodio, etc.), antioxidante (butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), etc.), agente colorante (color alquitrán, etc.), agente colorante (nitrito de sodio, ácido nitroso de sodio, etc.), agente blanqueante (sulfito de sodio), condimento (glutamato sódico MSG, etc.), edulcorante (dulcina, ciclamato, sacarina, sodio, etc.), agente aromatizante (vanillina, lactonas, etc.), agente expansor (alumbre, D-bitartrato de potasio, etc.), agente de refuerzo, emulsionante, espesante (pasta), agente de recubrimiento, base de goma, inhibidor de espumas, disolvente, mejorador y similares. Los aditivos pueden seleccionarse dependiendo de la clase de alimento y usarse en una cantidad apropiada.

La composición según un ejemplo puede añadirse por sí sola o usarse con otro alimento o componentes alimenticios, y puede usarse de manera adecuada según el método habitual. La cantidad de mezclado del principio activo puede determinarse de manera apropiada dependiendo del propósito de uso (prevención, salud o tratamiento terapéutico). En general, cuando se prepara un alimento o una bebida, la composición alimenticia de la presente solicitud puede añadirse en una cantidad de 50 partes en peso o menos, específicamente, 20 partes en peso o menos, basándose en el alimento o la bebida. Sin embargo, cuando se toma con fines de salud e higiene durante un largo periodo, puede estar comprendido un contenido inferior al intervalo anterior, y puesto que no hay ningún problema en cuanto a seguridad, el principio activo puede usarse en una cantidad superior al intervalo anterior.

Como un ejemplo de la composición alimenticia, puede usarse como composición de bebida saludable, y en este caso, al igual que una bebida habitual, pueden estar contenidos componentes adicionales tales como diversos agentes aromatizantes o un hidrato de carbono natural, o similares. El hidrato de carbono natural anteriormente mencionado puede ser monosacáridos tales como glucosa y fructosa; disacáridos tales como maltosa y sacarosa; polisacáridos tales como dextrina y ciclodextrina; alcoholes de azúcar tales como xilitol, sorbitol, eritritol y similares. Como edulcorante, pueden usarse edulcorantes naturales tales como extracto de estevia y taumatina; edulcorantes sintéticos tales como sacarina y aspartamo, y similares. La razón del hidrato de carbono natural puede ser generalmente de aproximadamente 0,01 a 0,04 g, específicamente, de aproximadamente 0,02 a 0,03 g, por 100 ml de la composición de bebida saludable de la presente solicitud.

Además, la composición de bebida saludable puede contener diversos nutrientes, vitaminas, electrolitos, agentes aromatizantes, agentes colorantes, ácido péctico, sales de ácido péctico, alginato, sales de alginato, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, agentes de ajuste del pH, estabilizadores, conservantes, glicerina, alcohol o agentes de carbonatación, o similares. Además, puede estar contenida pulpa para la preparación de zumo de frutas natural, bebida de zumo de frutas o bebida vegetal. Estos componentes pueden usarse independientemente o en combinación. La razón de estos aditivos no es muy importante, pero es habitual que se seleccione de un intervalo de 0,01 a 0,1 partes en peso por 100 partes en peso de la composición de bebida saludable de la presente solicitud.

La composición alimenticia según un ejemplo puede estar comprendida en diversos % en peso, siempre que pueda mostrar un efecto de prevención o mejora de un trastorno gástrico, pero por ejemplo, la composición según un ejemplo puede estar comprendida en una cantidad del 0,00001 al 100% en peso, del 0,01 al 80% en peso o del 10 al 50% en peso basándose en el peso total de la composición alimenticia.

La composición que comprende la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina según un ejemplo puede prevenir, tratar o mejorar un trastorno gástrico (por ejemplo, úlcera gástrica), inhibiendo la proliferación de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e inhibiendo la inflamación, el estrés oxidativo, el crecimiento vascular y/o la apoptosis inducidos por *Helicobacter pylori*.

La composición que comprende la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina según un ejemplo puede prevenir, tratar o mejorar un trastorno gástrico mediante el fomento de la síntesis y liberación de moco, el fomento de la regeneración tisular, la inhibición del daño a la mucosa gástrica, el fomento de la regeneración tisular, la inhibición del estrés oxidativo, la inhibición de la apoptosis de células de la mucosa gástrica y/o la inhibición de la inflamación.

En la composición según un ejemplo, se confirma que hay una diferencia en (i) el efecto de prevención o tratamiento de un trastorno gástrico y/o (ii) la eficacia anti-*Helicobacter pylori*, según esté contenida la cepa de *Corynebacterium* sp. o no; según esté comprendida la cepa de *Corynebacterium* sp. como una bacteria termoinactivada; la clase de la cepa de *Corynebacterium* sp.; presencia o ausencia del producto

cultivado; presencia o ausencia de treonina; y/o combinación de la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina, y se confirma que la composición según un ejemplo presenta los más excelentes.

Otro aspecto puede proporcionar un método para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico que comprende administrar la composición (composición para pienso, composición alimenticia o composición farmacéutica) para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico a un sujeto (paciente). La composición para pienso, composición alimenticia, composición farmacéutica y el trastorno gástrico se describen tal como anteriormente.

Según un ejemplo, el método para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico puede comprender además confirmar (seleccionar) un sujeto (paciente) que requiere la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico, antes de la administración.

En la presente solicitud, “sujeto” puede significar todos los animales incluyendo seres humanos que padecen o tienen riesgo de desarrollar un trastorno gástrico.

El sujeto diana al que se le aplica el método para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico puede ser un mamífero incluyendo seres humanos que padecen o tienen riesgo de desarrollar un trastorno gástrico, y por ejemplo, puede ser un cerdo, vaca, caballo, cabra, reno, oveja, gallina, pato, ganso, pavo, perro, gato y/o.

En la presente solicitud, “administración” significa introducir la composición para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico a un sujeto diana mediante cualquier método apropiado, y como vía de administración, puede administrarse a través de diversas vías orales o parenterales (por ejemplo, aplicación intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o local) que pueden llegar al tejido diana.

El método para la prevención, mejora o el tratamiento puede administrar la composición para pienso, composición alimenticia o composición farmacéutica según un ejemplo en una dosis (farmacéuticamente) eficaz. La cantidad de uso diaria total apropiada puede determinarse mediante el tratamiento dentro del intervalo de determinación médica correcto, y puede administrarse una o varias veces. Sin embargo,

la dosis eficaz terapéutica específica para un sujeto (paciente) específico puede aplicarse de manera diferente según diversos factores incluyendo una composición específica, la edad del sujeto (paciente), el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta, el momento de administración, la vía de administración y la tasa de secreción de la composición, el periodo de tratamiento y fármacos que van a usarse con la composición específica o usarse simultáneamente, y factores similares bien conocidos en el campo farmacéutico, además de la clase y el grado de la reacción que va a lograrse, y en algunos casos de si se usan otros agentes.

Otro aspecto puede proporcionar una composición antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina. La cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado, treonina y/o el trastorno gástrico comprendidos en la composición antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* se describen para la composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico.

Cuando se combinan la cepa de *Corynebacterium* sp., su producto cultivado y treonina según un ejemplo, el efecto antimicrobiano contra *Helicobacter pylori* puede ser sinérgicamente excelente.

Otro aspecto puede proporcionar una composición para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico, que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado, y la cepa y su producto cultivado pueden comprender treonina.

Otro aspecto puede proporcionar una composición para preparar un principio activo para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico que comprende una cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado (producto fermentado), y la cepa de *Corynebacterium* sp. o su producto cultivado (producto fermentado) pueden comprender o contener treonina.

La composición para preparar un principio activo para la prevención, mejora o el tratamiento de un trastorno gástrico puede comprender la cepa de *Corynebacterium* sp. de 0,1 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 10 a 90 partes en peso y la treonina de 10 a 80 partes en peso, basándose en la composición total. Específicamente, puede comprender la cepa de 0,2 a 5 partes en peso, el producto

fermentado de 12 a 88 partes en peso y la treonina de 10,5 a 78 partes en peso, la cepa de 0,3 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 13 a 87 partes en peso y la treonina de 11 a 77 partes en peso, la cepa de 0,4 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 14 a 86 partes en peso y la treonina de 11,5 a 76 partes en peso, la cepa de 0,5 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 15 a 85 partes en peso y la treonina de 12 a 75 partes en peso, la cepa de 0,6 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 16 a 84 partes en peso y la treonina de 12,5 a 74 partes en peso, la cepa de 0,7 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 17 a 83 partes en peso y la treonina de 13 a 73 partes en peso, la cepa de 0,8 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 18 a 82 partes en peso y la treonina de 13,5 a 72 partes en peso, la cepa de 0,9 a 5 partes en peso, el producto fermentado de 19 a 81 partes en peso y la treonina de 14 a 71 partes en peso, la cepa de 0,9 a 4 partes en peso, el producto fermentado de 20 a 80 partes en peso y la treonina de 14 a 70 partes en peso, la cepa de 1 a 4 partes en peso, el producto fermentado de 21 a 79 partes en peso y la treonina de 14 a 69 partes en peso, la cepa de 1 a 3 partes en peso, el producto fermentado de 22 a 78 partes en peso y la treonina de 14 a 68 partes en peso, basándose en la composición total, pero sin limitarse a los mismos.

La composición para preparar un principio activo para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico puede comprender además lignosulfonato de calcio, para ajustar el contenido de treonina. El lignosulfonato de calcio puede estar comprendido en una cantidad del 0,1 al 50% en peso, del 0,1 al 30% en peso, del 0,1 al 25% en peso, del 0,1 al 20% en peso, del 0,1 al 15% en peso, del 0,1 al 10% en peso, del 0,1 al 7% en peso, del 1 al 50% en peso, del 1 al 30% en peso, del 1 al 25% en peso, del 1 al 20% en peso, del 1 al 15% en peso, del 1 al 10% en peso, del 1 al 7% en peso, del 3 al 50% en peso, del 3 al 30% en peso, del 3 al 25% en peso, del 3 al 20% en peso, del 3 al 15% en peso, del 3 al 10% en peso, del 3 al 7% en peso, del 5 al 50% en peso, del 5 al 30% en peso, del 5 al 25% en peso, del 5 al 20% en peso, del 5 al 15% en peso, del 5 al 10% en peso, del 5 al 7% en peso, del 6,5 al 50% en peso, del 6,5 al 30% en peso, del 6,5 al 25% en peso, del 6,5 al 20% en peso, del 6,5 al 15% en peso, del 6,5 al 10% en peso, del 6,5 al 7% en peso, del 0,1 al 18% en peso, del 0,1 al 16% en peso, del 0,1 al 14% en peso, del 0,1 al 13% en peso, del 0,1 al 12% en peso, del 0,1 al 11% en peso, del 0,1 al 9% en peso, del 0,1 al 8% en peso o del 0,1 al 7% en peso, basándose en el peso total de la composición, pero sin limitarse a los mismos, y puede añadirse sin limitación de modo que la treonina en la composición alcance el contenido deseado.

Otro aspecto puede proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico que comprende la composición para preparar un principio activo para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico.

Otro aspecto puede proporcionar una composición alimenticia para la prevención o mejora de un trastorno gástrico que comprende la composición para preparar un principio activo para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico.

Otro aspecto puede proporcionar una composición para pienso para la prevención o mejora de un trastorno gástrico que comprende la composición para preparar un principio activo para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico.

Otro aspecto proporciona a formulación para tratar un trastorno gástrico que comprende la composición granular para preparar un principio activo para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico que comprende la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado (producto fermentado) como principio activo.

La cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto fermentado, el trastorno gástrico, la prevención, mejora y el tratamiento son tal como se describieron anteriormente.

En la presente solicitud, "formulación" se refiere a procesamiento para ser conveniente para la preparación, la conservación o el uso, y mostrar suficientemente un efecto terapéutico, mediante operaciones principalmente físicas, por ejemplo, pulverización, mezclado, amasado, lixiviación (destilación) o evaporación, o similares, sin cambiar la naturaleza de los fármacos, y además, los productos elaborados de ese modo también se denominan preparación medicinal (Chemistry Unabridged Dictionary, 2001. 5. 20., Sehwa editorial department).

Los aditivos usados cuando se formulan para preparar la formulación, es decir, la carga, el extensor, aglutinante, agente humectante, agente disgregante, diluyente o excipiente, son tal como se describieron anteriormente, y las formulaciones sólidas para administración oral y los aditivos comprendidos en las mismas, las formulaciones líquidas para administración oral y los aditivos comprendidos en las mismas o las formulaciones para administración parenteral y los aditivos añadidos a las mismas son tal como se describieron anteriormente.

La formulación puede ser una formulación sólida, formulación líquida y formulación de lecho fluidizado, pero sin limitarse a las mismas, y puede aplicarse sin limitación cualquier formulación que muestre el efecto de prevención, tratamiento y mejora de úlcera gástrica.

Las formulaciones son tal como se describieron anteriormente.

Otro aspecto puede proporcionar un método para la preparación de un principio activo que tiene (1) efecto de prevención, mejora o tratamiento de un trastorno gástrico; y/o (2) efecto antimicrobiano contra *Helicobacter pylori*, que comprende secar la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado.

La cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado son tal como se describieron anteriormente.

En un ejemplo, el secado puede realizarse mediante al menos un método seleccionado del grupo que consiste en secado a vacío, secado con aire caliente, liofilización, secado con aire ambiental, secado en película delgada y/o secado a vacío.

En un ejemplo, el secado puede secar una composición en la que la treonina se añade por separado a la cepa de *Corynebacterium* sp. y su producto cultivado.

En un ejemplo, el método para la preparación de un principio activo puede comprender además añadir por separado treonina a la materia seca preparada después del secado.

EFFECTOS VENTAJOSOS

Se confirma que la composición según la presente solicitud es excelente en cuanto a eficacia anti-*Helicobacter pylori* en el experimento con células, y eficacia de mejora de una úlcera gástrica, eficacia de la síntesis de mucosa gástrica y similares en el experimento con animales, y por tanto puede aplicarse como una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de un trastorno gástrico, o como una composición alimenticia o una composición para pienso para la prevención o mejora de un trastorno gástrico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la actividad antimicrobiana contra *H. pylori* de los grupos 1 a 8.

La figura 2a a la figura 2c muestran el resultado de medir la expresión de mediadores de la inflamación cuando se trataron las células RGM1 infectadas con 100 MOI con los grupos 1 a 8 durante 6 horas usando la cepa de *H. pylori*. Específicamente, la figura 2a muestra el cambio de expresión de ARNm de *Cox-2* según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en las células RGM1 infectadas con la cepa de *H. pylori*, y la figura 2b muestra el cambio de expresión de proteína de iNOS según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en las células RGM1 infectadas con la cepa de *H. pylori*, y la figura 2c muestra el cambio de expresión de proteína NF- κ B p65 fosforilada según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en las células RGM1 infectadas con la cepa de *H. pylori*. Se usan GAPDH y β -actina como controles internos de ARNm y proteína, respectivamente.

En la figura 2a a la figura 6b, N (primer carril desde la izquierda) representa el grupo de control negativo (célula RGM1 no tratada con *H. pylori*), y *H.p* (segundo carril desde la izquierda) representa el grupo de control positivo (célula RGM1 infectada con *H. pylori*), y los grupos 1 a 8 representan el resultado en la célula en la que se trata la célula RGM1 infectada con *H. pylori* con la composición de los grupos 1 a 8.

La figura 3a muestra el cambio de expresión de la proteína relacionada con el estrés oxidativo (HIF-1 α) según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*. Se usa β -actina como grupo de control interno. La figura 3b muestra el resultado de medir el cambio de concentración de oxígeno activo intracelular según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori* (resultado de aumento y disminución de DCF).

La figura 4a muestra el cambio de expresión de ARNm de HO-1 según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*, y la figura 4b muestra el cambio de expresión de proteína de GST(pi) y HO-1 según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*. Se usan GAPDH y β -actina como grupo de control interno.

La figura 5 muestra la eficacia de inhibición de la apoptosis según el tratamiento

de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*. Específicamente, la figura 5a muestra el cambio de expresión de proteína de Bax y Bcl-2 según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*, y se usa β -actina como grupo de control interno. La figura 5b muestra el cambio en la apoptosis (resultado de tinción con TUNEL) según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*.

La figura 6 muestra el resultado del cambio de factores de crecimiento de proliferación de la mucosa y angiogénesis según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*. La figura 6a muestra el cambio de expresión de proteína de TGF- β y VEGF según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*, y se usa β -actina como grupo de control interno. La figura 6b muestra el cambio de expresión de proteína de β -catenina según el tratamiento de los grupos 1 a 8 en la célula RGM1 infectada con *H. pylori*, y se usa Lamin B como grupo de control interno.

En la figura 7a a la figura 10, los grupos 1-4 significan los grupos experimentales animales 1-4 de la tabla 5.

La figura 7 muestra la eficacia de mejora de SRMD (enfermedad de la mucosa relacionada con el estrés) mediante la administración de la composición según un ejemplo en el grupo experimental de modelo animal de WIRS. Específicamente, la figura 7a muestra fotografías patológicas del estómago de cada grupo experimental, y las fotografías en las dos filas en la parte derecha se indican a un aumento x40. La figura 7b muestra (A) índice de lesión macroscópica (gráfico superior izquierdo), (B) inflamación; puntuación patológica (gráfico superior derecho), (C) úlcera/erosión; puntuación patológica (gráfico inferior izquierdo), (D) regeneración; puntuación patológica (gráfico inferior derecho), mediante la administración de la composición según un ejemplo en el grupo experimental de modelo animal de WIRS.

La figura 8 muestra el cambio de la inflamación, angiogénesis y señalización mediante la administración de la composición según un ejemplo en el grupo experimental de modelo animal de WIRS. (A) La figura 8a muestra el cambio de expresión de ARNm de iNOS, TNF- α e IFN- γ en los grupos experimentales animales 1-4, y la figura 8b muestra el cambio de expresión de ARNm de PDGF en los grupos experimentales animales 1-4, y la figura 8c muestra el cambio de expresión de proteína

de p-IkB α en los grupos experimentales animales 1-4, y la figura 8d muestra el cambio de proteína p-ERK y p-JNK en los grupos experimentales animales 1-4. Se usan GAPDH y β -actina como grupo de control interno de ARNm y proteína, respectivamente.

La figura 9 es el resultado que muestra el cambio de apoptosis y ciclo celular mediante la administración de la composición según un ejemplo en el grupo experimental de modelo animal de WIRS. Específicamente, la figura 9a es el resultado del análisis con TUNEL que muestra el nivel de apoptosis en la región con SRMD de la mucosa gástrica en los grupos experimentales animales 1-4, y la figura 9b muestra el cambio de expresión de proteína de PARP-1, Bcl-2, Bax, caspasa-8 escindida y caspasa-3 escindida, y la figura 9c muestra el cambio de expresión de proteína de CDK4 y ciclina D1. Se usa β -actina como grupo de control interno.

La figura 10 muestra el contenido de mucina en el tejido estomacal de los grupos experimentales animales 1-4.

La figura 11 muestra fotografías patológicas del estómago de ratas con WIRS en las que se administran muestras que comprenden treonina de diversos % en peso. La composición y el contenido de las muestras 1 a 5 de la figura 11 se dan a conocer en la tabla 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

A continuación en el presente documento, se describirá con detalle mediante ejemplos para ayudar a entender la presente solicitud. Sin embargo, los siguientes ejemplos ilustran el contenido de la presente solicitud, y el alcance de la presente solicitud no se limita a los siguientes ejemplos. Los ejemplos de la presente solicitud se proporcionan para describir más completamente la presente solicitud a los expertos en la técnica.

Ejemplo 1. Composición que contiene cepa de *Corynebacterium* sp. e infección de las células

Ejemplo 1-1. Preparación de composición que contiene cepa de *Corynebacterium* sp.

Para verificar la diferencia de la eficacia anti-*Helicobacter pylori*, la inhibición de la apoptosis y la protección celular de la composición de cepa que contiene una cepa de *Corynebacterium* sp., y la eficacia entre cepas de *Corynebacterium* sp., se prepararon las composiciones del grupo 1 al grupo 8.

Las cepas silvestres de *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), *Corynebacterium ammoniagenes* (*C. ammoniagenes*) y *Corynebacterium efficiens* (*C. efficiens*) fueron proporcionadas por CJ CheilJedang BIO R&D Center (Blossom park) y se usaron, y las cepas se inocularon en caldo para producir treonina respectivamente, y se cultivaron a 35°C durante 48 horas a 200 rpm. Los componentes y contenidos del caldo para producir treonina se dan a conocer en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Componente	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	30 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	100 mg
Biotina	1 mg
Extracto de levadura	2,5 g
Ácido pantoténico de calcio	1 mg
Clorhidrato de tiamina	1 mg
Carbonato de calcio	30 g
pH	6,8

El grupo 1 comprende sobrenadante de caldo fermentado en el que una célula microbiana se ha retirado centrifugando el caldo fermentado preparado cultivando *Corynebacterium glutamicum* en la condición anterior, y el grupo 2 es tampón (Tris-HCl) que comprende treonina a una concentración de 100 g/l. Los grupos 3 a 5 se prepararon centrifugando el caldo fermentado preparado cultivando la cepa en la condición anterior para recoger una célula microbiana, y suspendiendo la célula microbiana recogida en tampón (Tris-HCl). Los grupos 6 a 8 son caldo fermentado en el que cada cepa se cultiva en la condición anterior, y comprenden cada cepa y el

producto cultivado en el que cada cepa se ha cultivado en el medio (dado a conocer como ‘sobrenadante de caldo fermentado’ en la tabla 2). Las composiciones de los grupos 3 a 8 comprenden cada cepa a una concentración de DO de 30 (longitud de onda de 562 nm), y comprenden la cepa como bacteria termoinactivada a través de esterilización en autoclave.

Los grupos 1 a 8 comprenden todos ellos treonina, y hay un grupo que comprende treonina en cada cepa (comprendida en forma de bacteria termoinactivada) o producto cultivado, y por tanto, se añadió adicionalmente treonina (treonina producida a través de cepas de CJ BIO; pureza >99%) de modo que la concentración final de treonina en los grupos 1 a 8 fue de 100 g/l midiendo el contenido de treonina en la cepa y/o el producto cultivado.

Los componentes de cada grupo se dieron a conocer en la siguiente tabla 2. En la tabla 2, ‘sobrenadante de caldo fermentado’ del grupo 1 y grupo 6 significa que se retira una célula microbiana en el producto cultivado preparado cultivando la ‘cepa de *C. glutamicum*’ en la condición anterior, y el sobrenadante de caldo fermentado de los grupos 7 y 8 significa que se retira una célula microbiana en el producto cultivado preparado cultivando la ‘cepa de *C. ammoniagenes*’ y la ‘cepa de *C. efficiens*’ en la condición anterior.

Tabla 2

Grupo	Componentes en las composiciones
Grupo 1	Treonina + Sobrenadante de caldo fermentado
Grupo 2	Treonina
Grupo 3	Treonina + <i>C. glutamicum</i>
Grupo 4	Treonina + <i>C. ammoniagenes</i>
Grupo 5	Treonina + <i>C. efficiens</i>
Grupo 6	Treonina + <i>C. glutamicum</i> + Sobrenadante de caldo fermentado
Grupo 7	Treonina + <i>C. ammoniagenes</i> + Sobrenadante de caldo fermentado
Grupo 8	Treonina + <i>C. efficiens</i> + Sobrenadante de caldo fermentado

Los grupos 1-8 dados a conocer en los siguientes ejemplos 2 a 7 y la figura 1 a la figura 6b significan los grupos 1-8 de la tabla 2.

Ejemplo 1-2. Cultivo de líneas de células de la mucosa gástrica de rata

La línea de células de la mucosa gástrica de una rata normal, célula RGM1, se cultivó en medio mixto Ham F12 y DMEM (medio esencial modificado de Dulbecco) que comprendía suero bovino fetal al 10% con una incubadora de células a 37°C (el 95% de aire, el 5% de CO₂). La línea de células RGM1 fue establecida por el Profesor Matsui de la Universidad de Tsukuba de Japón, y se usó tras recibir su consentimiento.

Ejemplo 1-3. Cepa de *H. pylori* e infección de las células

La cepa de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (cepa positiva para el gen A asociado a citotoxinas [CagA], NCTC 11637) se adquirió de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD). La cepa de *H. pylori* se cultivó con agitación en la condición del 10% de CO₂ hasta 1X10⁸ UFC/ml (DO 600=1) en caldo de Brucella en el que se añadieron suero de ternero bovino al 5% y un antibiótico.

La célula RGM1 se infectó con la cepa de *H. pylori* durante 6 horas a la multiplicidad de infección (MOI) de 100:1 (a continuación en el presente documento, 100 MOI).

Ejemplo 2. Prueba de eficacia anti-*Helicobacter* de la composición que contiene cepa de *Corynebacterium* sp. *in vitro*

La eficacia de inhibición del crecimiento de *H. pylori*, es decir eficacia anti-*Helicobacter*, se midió en una placa de agar sangre usando el ensayo de difusión con discos. Específicamente, se disolvió 40 g/l de TSA (agar de soja Trypticase™) en agua purificada y después se sometió a esterilización en autoclave (121°C, 20 min). Después de enfriar hasta aproximadamente 50°C, se añadió sangre de oveja al 5%, y después se añadió un antibiótico {trimetoprim (5 mg/l), polimixina B (2500 U/l), vancomicina (10 mg/l)}. Se tomaron del medio alícuotas de 20 a 25 ml, se colocaron en la placa esterilizada, y después se almacenaron a 4°C.

Se tomaron alícuotas de 200 µl de disolución de la cepa de *H. pylori* y se extendieron sobre la placa de agar sangre preparada, y se absorbieron 40 µl de cada composición de los grupos 1 a 8 preparadas en el ejemplo 1-1 en cada papel de disco, y se cultivó en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 48 horas, y después se midió el

diámetro de la zona despejada alrededor del disco y se mostró en la figura 1 (el resultado del grupo 1 no se representó en el gráfico). En la figura 1, 'no tratado' significa que la célula RGM1 no está infectada con *H. pylori*.

Tal como se muestra en la figura 1, se confirmó que los grupos 6 y 7 tuvieron una actividad anti-*Helicobacter* significativa, ya que el valor numérico del diámetro de la zona despejada fue significativamente alto en los grupos 6 y 7 en comparación con el grupo no tratado.

Además, tuvo que derivarse la concentración apropiada de los grupos 1-8 que iba a usarse en los siguientes experimentos.

Se trataron *H. pylori* con las disoluciones diluidas en las que las composiciones de los grupos 1 a 8 preparadas en el ejemplo 1-1 se diluyeron en 1/4, 1/40 ó 1/100, de 40 µl, respectivamente, y se midió la viabilidad celular. A la concentración de dilución de 1/4, se mostró una viabilidad de 0,5 o menos en muchos grupos, y a la concentración de dilución de 1/100, no hubo una clara diferencia de resultados entre grupos, se usó en los siguientes experimentos la disolución diluida de 1/40 en la que se mostró una diferencia significativa de resultados en comparación con el grupo 1.

Ejemplo 3. Prueba de cambio de mediador de la inflamación y de NF-κB que transcribe el mismo mediante la composición que contiene cepa de *Corynebacterium* sp.

Al igual que el método del ejemplo 1-3, se trató la célula RGM1 infectada con *H. pylori* (100 MOI) con las composiciones de los grupos 1 a 8, diluidas en 1/40, de 40 µl, respectivamente durante 6 horas. Luego, en la célula RGM1 en la que se trataron las composiciones, se confirmó el nivel de expresión del mediador de la inflamación, ARNm de Cox-2, a través de análisis por RT-PCR (PCR con transcripción inversa), y el resultado se mostró en la figura 2a.

Específicamente, se extrajo ARN usando TRIzol (Gibco BRL, Rockville, MD), y el ARN extraído se sintetizó para dar ADNc usando transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Perkin Elmer, Morrisville, NC). La secuencia nucleica de cada cebador usado para el análisis por PCR se mostró en la siguiente tabla 3, y como patrón interno, se usó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 3

Gen	Cebador directo(5' → 3')	Cebador inverso(5' → 3')
IL-1β	CAG GCT CCG AGA TGA ACA ACA AA(SEQ ID NO: 1)	TGG GGA ACT CTG CAG ACT CA(SEQ ID NO: 2)
IL-8	CAG ACA GTG GCA GGG ATT CA(SEQ ID NO: 3)	TTG GGG ACA CCC TTT AGC AT(SEQ ID NO: 4)
Cox-2	GAA ATG GCT GCA GAG TTG AA(SEQ ID NO: 5)	TCA TCT AGT CTG GAG TGG GA(SEQ ID NO: 6)
iNOS	CTC ACT GGG ACT GCA CAG AA(SEQ ID NO: 7)	TGT TGA AGG GTG TCG TGA AA(SEQ ID NO: 8)
HO-1	GAC AGC ATG TCC CAG GAT TT(SEQ ID NO: 9)	GGT TCT GCT TGT TTC GCT CT(SEQ ID NO: 10)
HSP70	GAG TTG AGC GGC ATC CCG CC(SEQ ID NO: 11)	GTC CTA GAT TCA CAC CTG GAG(SEQ ID NO: 12)
Gapdh	GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA(SEQ ID NO: 13)	TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT(SEQ ID NO: 14)

Además, en la célula RGM1 en la que se trataron las composiciones, se confirmó el aumento y la reducción del nivel de expresión de proteína de iNOS y la fosforilación de NF-κB p65 que la transcribe a través de análisis por inmunotransferencia de tipo Western, y el resultado se mostró en la figura 2b y la figura 2c.

Específicamente, la célula cultivada tratando las composiciones se lavó con disolución de PBS (solución salina tamponada con fosfato), y después se disolvió con tampón de lisis celular (NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,5%, tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaF 25 mM, etilenglicol 20 mM-bis(ácido βN'-tetraacético, ditiotretitol 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, comprimido de cóctel de inhibidor de proteasas [Boehringer, Manneim, Alemania]) para elaborar un lisado de proteína. Después se someterlas a electroforesis mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida), se transfirió la proteína no plegada a una membrana de PVDF (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) para hacerla reaccionar con un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario, respectivamente, y después se analizó usando un sistema de quimioluminiscencia.

Tal como se muestra en la figura 2a, en comparación con la célula RGM1 normal (N), en la célula RGM1 infectada con *H. pylori* (*H.p*), el ARNm de Cox-2

aumentó significativamente, y el aumento de la expresión de ARNm de Cox-2 por la infección con *H. pylori* se redujo de lo más significativamente mediante la adición de la composición del grupo 6.

Tal como se muestra en la figura 2b y la figura 2c, la expresión de proteína de iNOS y la fosforilación de NF-κB p65 que la transcribe aumentaron significativamente por la infección con *H. pylori*, pero la expresión de proteína de iNOS y la fosforilación de NF-κB p65 que la transcribe disminuyeron de lo más significativamente mediante la adición de la composición del grupo 6. A partir del resultado, pudo observarse que la composición según un ejemplo regulaba la ruta de mediación de la inflamación por la cepa de *Helicobacter*.

Ejemplo 4. Prueba de eficacia de debilitamiento del estrés oxidativo mediante la composición que contiene cepa de *Corynebacterium* sp. in vitro

Al igual que el método del ejemplo 1-3, se trató la célula RGM1 infectada por *H. pylori* (100 MOI) con las composiciones de los grupos 1 a 8, diluidas en 1/40, de 40 µl, respectivamente durante 6 horas. Luego, se realizó inmunotransferencia de tipo Western mediante un método similar al ejemplo 3, y se midió el cambio del nivel de expresión de HIF-1α asociada al estrés oxidativo, y el resultado se mostró en la figura 3a.

Tal como se muestra en la figura 3a, HIF-1a aumentó significativamente por la infección con *Helicobacter pylori*, y la expresión de HIF-1a se redujo significativamente en los grupos 6 y 7.

Además, para medir el cambio de concentración de oxígeno reactivo intracelular, se analizó la reacción de potenciación con DCF utilizando una sonda de DCF-DA con un dispositivo de obtención de imágenes confocal. Una sustancia no fluorescente, DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) se oxida por especies reactivas del oxígeno (ROS) cuando están presentes peróxidos en una célula y muestra fluorescencia verde, y por tanto la cantidad de especies reactivas del oxígeno puede cuantificarse directamente mediante la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda específica. Específicamente, se tomaron de la célula RGM-1 (célula RGM1 no tratada con *H. pylori*; o célula RGM1 infectada con *H. pylori* (100 MOI) (ejemplo 1-3)) alícuotas de 5×10^5 células/pocillo, se colocaron en una placa de 24 pocillos, y se cultivaron en una

incubadora a 37°C (el 95% de aire, el 5% de CO₂) durante la noche, y después se trataron las composiciones de los grupos 1 a 8 durante un determinado tiempo, respectivamente. La célula se lavó con DMEM, y después se añadió DCF-DA 10 µg/ml (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO) al medio y se incubó en una incubadora durante 30 minutos. Después de la incubación, se observó la célula lavada con PBS de 4°C y se tomaron fotografías con un microscopio de fluorescencia, y el resultado se mostró en la figura 3b.

Tal como se muestra en la figura 3b, se confirmó que la intensidad de fluorescencia de DCF-DA, que aumentó después de la infección con *Helicobacter pylori*, se redujo de manera estadísticamente significativa en los grupos tratados con los grupos 1, 3, 6 y 8 ($P < 0,05$), y en el grupo tratado con el grupo 6, el grado de reducción ha sido el mayor ($P < 0,01$). A partir del resultado, pudo observarse que la composición según un ejemplo pudo hacer frente inmediatamente al estrés oxidativo o respuesta a la hipoxia por la cepa de *Helicobacter pylori*.

Ejemplo 5. Prueba de eficacia de protección celular mediada por antioxidación asociada a *Helicobacter pylori* mediante la composición que contiene cepa de *Corynebacterium* sp. in vitro

Al igual que el método del ejemplo 1-3, se trató la célula RGM1 infectada con *H. pylori* (100 MOI) con las composiciones de los grupos 1 a 8, diluidas en 1/40, de 40 µl, respectivamente durante 6 horas. Luego, se analizó el cambio de expresión de ARNm de HO-1 de la función antioxidación, un factor citoprotector representativo, mediante el método según el ejemplo 3 (PCR) y se mostró en la figura 4a, y se analizó el cambio de expresión de proteína de HO-1 y GST (glutación-s-transferasa(pi)) de manera similar al método según el ejemplo 3 (análisis por inmunotransferencia de tipo Western) y se mostró en la figura 4b.

Como resultado, en cuanto a la figura 4a y la figura 4b, en el grupo de control, se observó la reducción significativa de proteína y ARNm de HO-1 después de la infección con *Helicobacter pylori*, y en los grupos tratados con los grupos 6 a 8, la expresión reducida de HO-1 aumentó significativamente, y entre ellos, en el grupo tratado con el grupo 6, la expresión de HO-1 aumentó de lo más significativamente. Además, tal como se muestra en la figura 4b, en los grupos 6 y 7, la expresión de GST(pi) se redujo significativamente, y entre ellos, en el grupo tratado con el grupo 6, la

expresión de GST(pi) se redujo de lo más significativamente.

A partir del resultado, pudo observarse que la composición según un ejemplo mostró acción antioxidación y eficacia de protección celular basándose principalmente en la reacción de HO-1 a la cepa de *Helicobacter pylori*.

Ejemplo 6. Prueba de eficacia de inhibición de la apoptosis asociada a *Helicobacter pylori* mediante la composición que contiene cepa de *Corynebacterium sp. in vitro*

Al igual que el método del ejemplo 1-3, se trató la célula RGM1 infectada con *H. pylori* (100 MOI) con las composiciones de los grupos 1 a 8, diluidas en 1/40, de 40 µl, respectivamente durante 6 horas. Luego, mediante un método similar al ejemplo 3, se confirmó la expresión de Bcl-2 y Bax mediante inmunotransferencia de tipo Western, y el resultado se mostró en la figura 5a, y se analizó la apoptosis mediante tinción con TUNEL, y el resultado se mostró en la figura 5b. Específicamente, la tinción con TUNEL se llevó a cabo tomando alícuotas de la célula, colocándolas en un portaobjetos de cámara Lab-Tek en 1x10⁵ células/cámara y después cultivando en una incubadora a 37°C (el 95% de aire, el 5% de CO₂). Luego, después de tratar cada reactivo durante un determinado tiempo, se realizó mediante el método experimental del fabricante usando un kit de detección de apoptosis (Oncogene Research Products, Cambridge, MA). Se retiró la disolución cultivada y se lavó con disolución de PBS 3 veces, y después se añadió PFA (paraformaldehído) al 4% y se fijó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de volver a lavar con PBS dos veces, se trató con Triton X-100 al 0,1% a 4°C durante 5 minutos, y se bloqueó la luz y después se le hizo reaccionar con una disolución elaborada mezclando TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) y mezcla de nucleótidos a 37°C durante 60 minutos. Después de lavar con PBS, se observó apoptosis con un microscopio de fluorescencia.

Tal como se muestra en la figura 5a, la reducción de la expresión de Bcl-2 y el aumento de la expresión de Bax pudieron observarse en la célula infectada con *H. pylori* (*H.p*), y pudo confirmarse que la expresión significativamente aumentada de Bax se redujo y que la expresión reducida de Bcl-2 aumentó en los grupos tratados con los grupos 6 a 8, y entre ellos, en el grupo tratado con el grupo 6, el efecto fue el más excelente.

Se sabe que la infección por *Helicobacter pylori* induce daño a la mucosa y úlcera mediante un aumento significativo de apoptosis, y tal como se muestra en la figura 5b, en el resultado de la tinción con TUNEL, el aumento estadísticamente significativo de apoptosis se observó por la infección con *Helicobacter pylori* ($P<0,01$), pero en los grupos tratados con los grupos 6 a 8, la apoptosis se redujo significativamente, y entre ellos, en el grupo tratado con el grupo 6, la apoptosis se redujo en su mayoría.

Ejemplo 7. Prueba de cambio de factor de proliferación, crecimiento vascular y crecimiento celular asociado a *Helicobacter pylori* mediante la composición que contiene cepa de *Corynebacterium sp. in vitro*

Al igual que el método del ejemplo 1-3, se trató la célula RGM1 infectada con *H. pylori* (100 MOI) con las composiciones de los grupos 1 a 8, diluidas en 1/40, de 40 μ l, respectivamente durante 6 horas. Luego, mediante un método similar al ejemplo 3, se analizó el cambio de TGF- β y VEGF mediante inmunotransferencia de tipo Western, y el resultado se mostró en la figura 6a.

Como resultado, tal como se muestra en la figura 6a, TGF- β y VEGF, que aumentaron por la infección con *Helicobacter pylori*, fomentaron una proliferación indiscriminada de mucosa o inflamación cancerosa, pero en los grupos tratados con los grupos 6 a 8, la expresión de TGF- β y VEGF se redujo significativamente, y en particular, en el grupo tratado con el grupo 6, la expresión de TGF- β y VEGF se redujo en su mayoría. A partir de esto, se mostró el resultado de que la composición según un ejemplo pudo aliviar toda la inflamación o cancerización mediante la infección por *Helicobacter pylori*.

Además, se confirmó la transferencia nuclear de β -catenina utilizando una fracción nuclear en la célula infectada con *Helicobacter pylori* mediante inmunotransferencia de tipo Western, y el resultado se mostró en la figura 6b. Tal como se muestra en la figura 6b, se confirmó que la transferencia nuclear de β -catenina que aumentó por la infección con *Helicobacter pylori* pudo inhibirse significativamente mediante el tratamiento del grupo 6.

Todos los valores experimentales de los ejemplos 1 a 7 se verificaron estadísticamente mediante el método a través de la prueba de la T, y se definió $p<0,05$

o más como estadísticamente significativo.

Ejemplo 8. Preparación de muestra que comprende treonina

Se purificó caldo fermentado preparado inoculando cepa silvestre de *C. glutamicum* (CJ CheilJedang BIO R&D Center (Blossom park)) en caldo para producir treonina (tabla 1) y cultivándolo en la condición de 35°C y 200 rpm durante 48 horas y se cristalizó para preparar la muestra 1. La muestra 1 comprendía el 99% en peso o más de treonina purificada en forma de polvo.

Se secó (secado con aire caliente a de 60 a 70°C) directamente caldo fermentado (que comprendía *C. glutamicum*) obtenido cultivando *C. glutamicum* en un medio para producir treonina para preparar la muestra 2. Además, se añadió lignosulfonato de calcio (Aladdin industrial Co., Shanghai, China) al caldo fermentado obtenido cultivando *C. glutamicum* en la condición anterior en diversos contenidos, y se secó (secado con aire caliente a de 60 a 70°C) el caldo fermentado (que comprendía *C. glutamicum*) al que se le añadió lignosulfonato de calcio para preparar las muestras 3 a 5. Las muestras 2 a 5 comprendían *C. glutamicum* en forma de bacteria termoinactivada a través de secado con aire caliente.

Las muestras 2 a 5 se prepararon en forma de gránulo que tenía un tamaño de partícula de aproximadamente 200 a 1000 µm. Los componentes y contenidos de las muestras 1 a 5 se dieron a conocer en la tabla 4. En la tabla 4, Thr (% en peso), lignosulfonato de calcio (% en peso) y otros componentes del producto fermentado (que comprendía célula microbiana de *C. glutamicum*) (% en peso) significan % en peso en la materia seca preparado secando el caldo fermentado, y el producto fermentado en la materia seca comprende la cepa de *C. glutamicum*. Además, el contenido de cepa de *C. glutamicum* comprendida en el producto fermentado se dio a conocer en la tabla 4.

Tabla 4

	Thr (% en peso)	Producto fermentado (% en peso)	<i>C. glutamicum</i> en el producto fermentado (% en peso) ¹	Lignosulfonato de calcio (% en peso)
Muestra 1	100,0	-	-	-
Muestra 2	75	25,0	4,0	0,0
Muestra 3	70	23,3	3,8	6,7
Muestra 4	65	21,7	3,5	13,3
Muestra 5	60	20,0	3,2	20,0

¹ valor convertido cuando se seca el contenido de la célula microbiana en el producto fermentado

Ejemplo 9. Preparación del modelo de WIRS (estrés de retención por inmersión en agua) para SRMD (enfermedad de la mucosa relacionada con el estrés)

Se adquirieron 110 ratas SD en total de Charles River (Osaka, Japón) y se almacenaron en una instalación para animales. Los animales experimentales se manipularon en la instalación para animales autorizada según la Política Internacional para el Cuidado de Animales de la AAALAC. Los animales estuvieron en ayunas 24 horas antes de exponerse a WIRS, y el agua estaba disponible a voluntad. Se colocaron 10 ratas de cada grupo en una jaula para WIRS y se sumergieron en agua durante 6 horas.

La muestra 1 a la muestra 5 preparadas en el ejemplo 8 se administraron por vía oral a ratas 8 horas antes del tratamiento de WIRS, de modo que se administró la misma cantidad de treonina (0,15% en peso/dieta), y después de aplicar WIRS durante 6 horas, se sacrificaron los animales y se extrajo el estómago y se realizó una incisión y se retiró el contenido, y se tomó una imagen de la superficie interna del estómago y esta se mostró en la figura 11. Tal como se muestra en la figura 11, como resultado de observar el tejido estomacal de ratas a simple vista, pudo confirmarse que en el grupo al que se le indujo WIRS (la segunda fila en la figura 11), se provocó gastrorragia, y el grado de gastrorragia se redujo (efecto terapéutico excelente de úlcera gástrica) en el orden de muestra 1 < muestra 5 < muestra 4 < muestra 3 o muestra 2.

Por otro lado, el siguiente experimento se llevó a cabo dividiendo en 4 grupos experimentales animales tal como se indica en la siguiente tabla 5. Se dividieron en un grupo no tratado en el que no se trató nada después de la administración oral de solución salina (grupo de control positivo, grupo experimental animal 1), grupo WIRS en el que se aplicó WIRS durante 6 horas (grupo de control negativo, grupo experimental animal 2) y grupos experimentales animales en los que se trataron por vía oral con pienso que contenía muestra 1 (preparada en el ejemplo 8) del 0,15% en peso (grupo experimental animal 3) y pienso que contenía muestra 3 (preparada en el ejemplo 8) del 0,21% en peso (grupo experimental animal 4) mediante 30 mg/kg de peso corporal, respectivamente, 8 horas antes del tratamiento de WIRS. El contenido de L-Thr (L-treonina) en el pienso de los grupos experimentales animales 3 y 4 se estableció al 0,15% en peso/dieta equitativamente.

Tabla 5

Grupo experimental animal	Animal experimental	Inducción de WIRS	Sustancia de prueba (suministrada 8 horas antes del tratamiento de WIRS)	Dosis de administración (% en peso/dieta)	Número de animales
1	Rata	No	Grupo de control positivo (sin estrés, sin Thr)	0	10
2		Inducción de WIRS durante 6 horas	Grupo de control negativo (sin Thr)	0	20
3			Muestra 1 (ejemplo 8; L-Thr)	0,15	10
4			Muestra 3 (ejemplo 8; L-Thr + producto fermentado de <i>C. glutamicum</i> (que comprendía una célula microbiana))	0,21	10

Todos los animales experimentales (ratas) se sacrificaron con una dosis alta de anestésico (tiopental sódico, 50 mg/kg) después de 6 horas de WIRS. Los grupos experimentales animales 1-4 dados a conocer en los siguientes ejemplos 10 a 12 significan los grupos experimentales animales 1-4 de la tabla 5, y en la figura 7a a la figura 10, los grupos 1-4 significan los grupos experimentales animales 1-4 de la tabla 5.

Ejemplo 10. Prueba de eficacia de mejora de SRMD (enfermedad de la mucosa relacionada con el estrés)

Se realizó una incisión al estómago de la rata sacrificada en el ejemplo 9 y se abrió a lo largo de la curvatura más larga, y después se lavó con disolución de PBS fría. Después de determinar el número y tamaño de erosiones o úlceras mediante fotografías ampliadas, la mitad se anatomizó para la observación anatómica. El estómago al que se le realizó una incisión se extendió sobre una lámina de plástico y se fijó en tampón formalina al 10% durante 4 horas y se usó para la producción de un corte tisular con parafina, y la otra mitad se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido para la observación biológica molecular. Además, el homogeneizado de mucosa se almacenó mezclando los mismos grupos experimentales animales.

La muestra de estómago se observó usando un microscopio a simple vista (figura 7a), y en el grupo de control y cada grupo experimental (grupos experimentales animales 1-4), se calcularon el índice de lesión macroscópica, inflamación; puntuación patológica, úlcera/erosión; puntuación patológica, regeneración; puntuación patológica y se mostraron en la figura 7b. Tal como se muestra en la figura 7a, se mostró una aparición significativa de SRMD tal como erosiones, hemorragia y úlceras en todas las ratas del grupo experimental animal 2, pero la SRMD se mejoró significativamente en el grupo experimental animal 3 y grupo experimental animal 4. Tal como se muestra en la figura 7b, el índice de lesión macroscópica, inflamación; puntuación patológica, úlcera/erosión; puntuación patológica, regeneración; puntuación patológica se mejoraron significativamente ($p < 0,05$) en los grupos experimentales animales 3 y 4, y en particular, el índice de lesión macroscópica del grupo experimental animal 4 fue significativamente más bajo que el del grupo experimental animal 3, y la regeneración; puntuación patológica se mejoró significativamente con respecto al grupo experimental animal 3.

Ejemplo 11. Prueba de eficacia antiinflamatoria

Dado que SRMD estaba fisiológicamente relacionada con daño por isquemia-reperfusión, en los grupos experimentales animales 1 a 4, se midieron la expresión de ARNm de factores de crecimiento angiogénicos incluyendo PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y la expresión de ARNm de mediadores de la inflamación, iNOS, TNF- α , IFN- γ y PDGF, y el resultado se mostró en la figura 8a y la figura 8b.

Específicamente, se extrajo el ARN total usando el minikit RNeasy (Qiagen Korea, Seúl, Corea). Los cebadores usados para medir la expresión de citocinas inflamatorias y mediadores se mostraron en la siguiente tabla 6. Se analizó la amplificación usando tampón de reacción 10x (Promega Korea, Seúl, Corea), MgCl₂ 1,5 mM/l, desoxinucleótido trifosfato (dNTP) 200 mM/l, cada cebador 1 mM/l y ADN polimerasa Taq (Promega) 2,5 unidades, usando el sistema de PCR GeneAmp 2400 de Perkin-Elmer. Cada ciclo se componía de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 45 minutos y amplificación a 72°C durante 45 segundos.

Tabla 6

Gen	Cebador directo(5'→3')	Cebador inverso(5'→3')
IL-8	CACTCCCAGCATCGTAGAGC(SEQ ID NO: 15)	CAGTGTACTTGTGGCGTGGA(SEQ ID NO: 16)
iNos	TTTTCCCAGGCAACCAGACG(SEQ ID NO: 17)	GTAGCGGGGTTCAGAATGG(SEQ ID NO: 18)
IFN-γ	ATCCATGAGTGCTACACGCC(SEQ ID NO: 19)	TCTGTGGGTGTTCACCTCG(SEQ ID NO: 20)
HIF-1α	TATCACTGGACTTCGGCAGC(SEQ ID NO: 21)	GCTGCCGAAGTCCAGTGATA(SEQ ID NO: 22)
PDGF	AGGAAGCCATTCCCGCAGTT(SEQ ID NO: 23)	CTAACCTCACCTGGACCTCT(SEQ ID NO: 24)
VEGF	CAATGATGAAGCCCTGGAGT(SEQ ID NO: 25)	GATTTCTTGCGCTTTCGTTT(SEQ ID NO: 26)
TNF-α	CCCTCACACTCAGATCATCTTCTCA A(SEQ ID NO: 29)	TCTAAGGTACTTGGGCAGGTTGACC TC(SEQ ID NO: 30)
GAPDH	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA(SEQ ID NO: 27)	TTCAGCTCTGGGATGACCTT(SEQ ID NO: 28)

Además, en cada uno de los grupos experimentales animales 1-4, se midió el nivel de proteína de p-IkBα, p-ERK y p-JNK y se mostró en la figura 8c y la figura 8d. Específicamente, para realizar inmunotransferencia de tipo Western para medir el nivel de proteína, se homogeneizó la mucosa gástrica recogida en tampón Tris-HCl 20 mM helado (pH 7,5) que contenía EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 2 mM, EGTA (ácido tetraacético de etilenglicol) 0,5 mM, sacarosa 300 mM y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 2 mM con un homogeneizador tisular. Después de la electroforesis

de proteína de 30 µg en gel de SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida) al 8%, se transfirió a una membrana de PVDF (poli(fluoruro de vinilideno)) usando un sistema de transferencia semiseco (Hoefer, Holliston, MA, EE.UU.). Se bloqueó la unión no específica mediante incubación con leche seca desnatada al 5%. La membrana se incubó termostáticamente con una disolución diluida 500 veces de un anticuerpo primario a 4°C durante la noche, y después se incubó con un anticuerpo secundario de unión a HRP (peroxidasa de rábano) diluido en 1:1000. Se detectó el inmunocomplejo usando el kit de detección ECL (Amersham Biosciences Korea, Seúl, Corea) y se irradió automáticamente la película de rayos X. Los anticuerpos usados para la inmunotransferencia de tipo Western fueron los siguientes. Se adquirieron los anticuerpos contra β-actina, iNOS (óxido nítrico sintasa), COX-2 (ciclooxigenasa), P-JNK (fosfor-JNK), P-ERK (fosfor-ERK), Bcl-2 (linfoma de células B 2), Bax (proteína X asociada a linfoma de células B 2) y ciclina D1 de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Se adquirieron p-IkBα (inhibidor fosforilado de kappa B alfa), p-STAT3 (transductor de señales fosforilado y activador de transcripción 3), PARP (polimerasa poli(ADP-ribosa)), CDK4 (cinasa dependiente de ciclina 4) y CDK2 (cinasa dependiente de ciclina 2) de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Se adquirió el anticuerpo contra HO-1 (hemo oxigenasa-1) de Enzo life Sciences (Farmingdale, NY).

Tal como se muestra en la figura 8a, en el grupo experimental animal 2 (SRMD inducida por WIRD), la expresión de ARNm de iNOS, TNF-α e interferón gamma (IFN-γ) aumentó significativamente, pero la expresión aumentada de los mediadores de la inflamación (iNOS, TNF-α, IFN-γ) se redujo significativamente en el grupo experimental animal 3 o grupo experimental animal 4 ($P < 0,01$ o $P < 0,05$, figura 8a), y la expresión de TNF-α e iFN-γ se redujo significativamente, en particular en el grupo experimental animal 4 en comparación con el grupo experimental animal 3 ($P < 0,05$, figura 8a).

Tal como se muestra en la figura 8b, la expresión del factor de crecimiento angiogénico, PDGF, aumentó significativamente en el grupo experimental animal 2, pero se redujo significativamente en el grupo experimental animal 3 o grupo experimental animal 4 ($P < 0,01$, figura 8b), y en particular, en el grupo experimental animal 4, el nivel de reducción fue más alto.

Tal como se muestra en la figura 8c, como resultado de medir la expresión de p-IkBα a nivel de proteína, la expresión de p-IkBα se redujo significativamente mediante WIRS en el grupo experimental animal 2, y la reducción de la expresión de p-IkBα

estaba relacionada con la activación transcripcional de NF- κ B. Mientras tanto, la expresión reducida de p-I κ B α aumentó significativamente ($P<0,01$, figura 8c), y la expresión de p-I κ B α aumentó significativamente en el grupo experimental animal 4 en comparación con el grupo experimental animal 3 ($P<0,01$, figura 8c), y el aumento de la expresión de p-I κ B α indujo inhibición redox de NF- κ B.

Por otro lado, con respecto a la señalización relacionada con isquemia e inflamación, tal como se muestra en la figura 8d, en el grupo experimental animal 2, se mostró la activación de p-ERK y p-JNK, y en el grupo experimental animal 4, la señalización se inactivó por completo, pero en el grupo experimental animal 3, se inactivó parcialmente ($P<0,01$).

Ejemplo 12. Prueba de eficacia de protección de la mucosa gástrica

Dado que la SRMD que provoca erosiones o úlceras mostraba apoptosis aumentada en la región correspondiente, se midió la apoptosis en la mucosa gástrica según el grupo experimental animal. Específicamente, la apoptosis se visualizó usando el kit de detección de fragmentación de ADN TdT FragEL (Oncogene Research Products, Cambridge, MA) y el método de TUNEL (marcaje de final de corte mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal). Para medir el AI (índice apoptótico) hallando una región en la que se produce apoptosis en una gran cantidad (foco apoptótico) en cada grupo experimental, se amplió la sección inmunoteñida con TUNEL (sección inmunoteñida con marcaje de final de corte de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL)) 100 veces y se examinó. Luego, se contó el número de células positivas para TUNEL en 400 campos para registrar el AI. Se determinó el coeficiente medio mediante selección de al menos 5 focos al azar en fragmentos que incluían lesiones corrosivas o ulcerosas, y el resultado se mostró en la figura 9a, y el resultado se indicó mediante el porcentaje medio del número total de células. Tal como se muestra en la figura 9a, la apoptosis aumentó significativamente en el grupo experimental animal 2 en comparación con el grupo experimental animal 1, y el nivel de apoptosis aumentado se redujo significativamente en el grupo experimental animal 3 y grupo experimental animal 4 en comparación con el grupo experimental animal 2 ($P<0,01$, figura 9a), y se observó a un nivel significativamente más bajo en el grupo experimental animal 4 en comparación con el grupo experimental animal 3 ($P<0,01$, figura 9a).

Para verificar el resultado de TUNEL, para la expresión de Bcl-2, proteína de prevención de la apoptosis y PARP escindida, Bax, caspasa-8 escindida y caspasa-3 escindida que inducen apoptosis, se realizó el análisis por inmunotransferencia de tipo Western mediante el método del ejemplo 11, y el resultado se mostró en la figura 9b.

Tal como se muestra en la figura 9b, la expresión de Bax, caspasa-8 escindida, caspasa-3 escindida y división de PARP aumentaron significativamente en el grupo experimental animal 2, y la expresión de Bax, caspasa-8 escindida, caspasa-3 escindida y división de PARP aumentadas se redujo significativamente en los grupos experimentales animales 3 y 4, y se observaron a un nivel significativamente más bajo, en particular en el grupo experimental animal 4 en comparación con el grupo experimental animal 3. Por otro lado, la expresión de Bcl-2, la proteína de prevención de la apoptosis, aumentó significativamente en el grupo experimental animal 4 (figura 9b).

La actividad de CDK4 y ciclina D1, genes relacionados con el ciclo celular, se confirmó a nivel de proteína mediante el método según el ejemplo 11, y el resultado se mostró en la figura 9c. Tal como se muestra en la figura 9c, la expresión de CDK4 y ciclina D1 aumentó significativamente en el grupo experimental animal 2 ($P < 0,01$), y la expresión aumentada de CDK4 y ciclina D1 se redujo significativamente en los grupos experimentales animales 3 y 4. En particular, la expresión de CDK4 y ciclina D1 fue significativamente más baja en el grupo experimental animal 4 en comparación con el grupo experimental animal 3 (figura 9c, $P < 0,01 \sim 0,05$).

En el tejido estomacal de los grupos experimentales animales 1 a 4, el contenido de mucina se confirmó mediante tinción con PAS, y el resultado se mostró en la figura 10. Tal como se muestra en la figura 10, la mucina gástrica se observó a un nivel significativamente bajo en el grupo experimental animal 2 ($P < 0,01$), y la expresión de moco gástrico se conservó significativamente en los grupos experimentales animales 3 y 4, y la expresión de moco fue significativamente más alta en el grupo experimental animal 4 que en el grupo 3 ($P < 0,01$).

A partir del resultado anterior, pudo observarse que WIRS puso en peligro la integridad de la mucosa, pero esta amenaza se alivió mediante el tratamiento previo de la composición (muestra) según un ejemplo.

El resultado de los ejemplos 8 a 11 se representó mediante la media $\pm$ DE. Los

datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) unilateral, y la significación estadística entre grupos se determinó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. La significación estadística convergió a $P < 0,05$.

A partir de la descripción anterior, los expertos en la técnica a la que pertenece la presente solicitud entenderán que la presente solicitud puede implementarse en otras formas específicas sin cambiar su espíritu técnico o sus características esenciales. En este respecto, debe entenderse que los ejemplos descritos anteriormente son ilustrativos en todos los aspectos y no restrictivos. El alcance de la presente solicitud debe interpretarse como el significado y alcance de las siguientes reivindicaciones en lugar de la descripción detallada anterior, y todas las modificaciones o formas modificadas derivadas del concepto equivalente se incluyen en el alcance de la presente solicitud.