



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 315**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 2/38 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04772097 .4**

96 Fecha de presentación : **18.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1661983**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54

Título: **Bacterias ácido-lácticas que presentan un efecto de inmunopotenciación de las mucosas.**

30

Prioridad: **21.08.2003 JP 2003-297570**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

73

Titular/es: **OTSUKA PHARMACEUTICAL Co., Ltd.**
9, Kandatsukasa-cho 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 101-8535, JP

72

Inventor/es: **Yamahira, Satoko;**
Toba, Masamichi y
Okamatsu, Hiroshi

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 356 315 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a bacterias ácido-lácticas y a las composiciones que contienen las bacterias, y más específicamente, a las bacterias ácido-lácticas que pueden estimular la inmunidad de las mucosas, y a los alimentos y bebidas que contienen las bacterias.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Muchas bacterias ácido-lácticas se detectan en alimentos vegetales tales como encurtidos, kimchi (encurtidos coreanos), sake (alcohol japonés), miso (pasta de alubias) y salsa de soja. El profesor Sanae Okada de la Tokyo Unveristy of Agriculture ha denominado a las bacterias ácido-lácticas detectadas en los alimentos vegetales "bacterias ácido-lácticas vegetales" y sugiere distinguirlas de las bacterias ácido-lácticas procedentes de alimentos de animales tales como la leche fermentada y el queso (*Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 13, nº 1, págs. 23-26 (2002)). Esto es debido a que las bacterias ácido-lácticas vegetales se diferencian de las bacterias ácido-lácticas animales en los medios de cultivo y pueden utilizar muchas más clases de azúcares y adaptarse a medios más severos desde el punto de vista de la resistencia a las sustancias antibacterianas, de la resistencia a las enzimas, de la resistencia al oxígeno, etc.

A partir de Mao Y. *et al.*, *Microbial Ecology in Health and Disease*, Vol. 9, nº 6, 1996, págs. 261-269, así como en la patente JP 2002080364 y Bibas Bonet M. E. *et al.*, *Food and Agricultural Immunology*, Vol. 11, nº 3, 1999, págs. 259 a 267, resultan conocidas cepas específicas de *Lactobacillus* así como de *Streptococcus* que aumentan la inmunidad o estimulan la producción de IgA. Sin embargo, ha sido difícil obtener bacterias específicas que tengan un efecto excelente y mejorado sobre la estimulación de la producción de IgA y en la estimulación de la inmunidad microbiana. Además, Vitini *et al.*, *Biocell*, Vol. 24, nº 3, diciembre de 2000, págs. 223 a 232, corresponde a la inmunoestimulación de la mucosa del intestino por bacterias ácido-lácticas y se determinó en este artículo si estas bacterias ácido-lácticas podían estimular la respuesta inmunitaria específica, la respuesta inmunitaria inespecífica o ambas. Los autores indican que es importante seleccionar una bacteria ácido-láctica específica para ser utilizada como adyuvante de la mucosa intestinal; por último el documento WO 01/97821 se refiere a la inmunoterapia o al tratamiento bacteriano o a la infección vírica en las superficies de las mucosas, con probióticos y composiciones de los mismos. No existe ninguna referencia a una cepa específicamente ventajosa en este documento.

Se han investigado estas bacterias ácido-lácticas vegetales y han informado ya de que la leche fermentada preparada utilizando la cepa ONC141 de *Lactobacillus plantarum* como iniciadora presenta las capacidades siguientes: mejora de la microflora gastrointestinal humana (Megumi Kumemura, Masamichi Toba, Yoshiro Sogawa, Seiichi Shimizu, Shinzo Kawaguchi, "*Enterobacteriology Magazine*", 15, 15, (2001)); aumento de la frecuencia de defecación en los adultos con estreñimiento (Masamichi Toba, Megumi Kumemura, Satoshi Muneyuki, Yoshiro Sogawa, Hisao Yoshizawa, Yoichi Yajima, Yutaka Matsuda, Hajime Iijima, "*Enterobacteriology Magazine*", 15, 21, (2001)); y aumento de la resistencia del hospedador a la infección bucal con aumento de la producción de la salmonella patógena *S. typhimurium* (aumento de la producción de IgA, estimulación de la mucosa del aparato gastrointestinal) (Takeshi Ikenaga, Satoko Yamahira, Hideki Nachi, Masamichi Toba, Hiroshi Okamatsu, "*Milk Science*", Vol. 51, nº 1, págs. 27-32 (2002)).

La cepa ONC141 de *Lactobacillus plantarum* (leche fermentada) presenta los efectos mayores de aumento en la resistencia del hospedador a la infección por salmonella entre los vegetales conocidos y las bacterias ácido-lácticas de animales y se considera por lo tanto que puede potenciar las funciones inmunitarias de las mucosas y es muy útil para la defensa en hospedadores humanos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un objetivo de la invención consiste en proporcionar bacterias ácido-lácticas que pueden conseguir mayor inmunoestimulación de las mucosas y mejora del mecanismo de defensa del hospedador en comparación con las ya investigadas y desarrolladas, y que son útiles como probióticos, y proporcionan además productos finales que contienen dichas bacterias ácido-lácticas (alimentos y bebidas tales como leches fermentadas y bebidas con bacterias ácido-lácticas).

Se obtuvo recientemente y probaron en muchos microorganismos diversos sus capacidades para inducir la producción de IgA utilizando un sistema de cultivo de células de los parches de Peyer de ratón. Como resultado, se descubrieron dos cepas de bacterias ácido-lácticas que presentan capacidades de inducir la producción de IgA particularmente excelentes. Se ha realizado más investigación basada en este descubrimiento y llevado a cabo la invención.

La presente invención proporciona las invenciones resumidas en los apartados 1 a 15 a continuación.

Apartado 1: Composición que comprende una cepa de bacterias ácido-lácticas seleccionadas de entre el grupo constituido por *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM-BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM-BP-10065), y un vehículo comestible, pudiendo la composición estimular la inmunidad de las mucosas y estar en forma de alimento o

bebida.

Apartado 2: Composición según el apartado 1 que es una leche fermentada, una bebida con bacterias ácido-lácticas, una bebida de vegetal fermentado, una bebida de fruta fermentada o una bebida con leche de soja fermentada.

5 Apartado 3: Utilización de la composición del apartado 1 ó 2 para la preparación de una composición de alimento o bebida para estimular la inmunidad de las mucosas en una persona que necesita dicha estimulación.

Apartado 4: Utilización de la composición del apartado 1 ó 2 para la preparación de una composición de alimento o bebida para estimular la producción de IgA en una persona que necesita dicho tratamiento de estimulación de la producción de IgA.

10 Apartado 5: Composición según el apartado 1 que está en forma de gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos efervescentes o cremas (puddings).

Apartado 6: Composición farmacéutica para la inmunoestimulación de las mucosas humanas que comprende una cepa de bacterias ácido-lácticas seleccionadas de entre el grupo constituido por *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM-BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM-BP-10065) y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 Apartado 7: Composición farmacéutica para estimular la producción de IgA humana que comprende una cepa de bacterias ácido-lácticas seleccionadas de entre el grupo constituido por *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM-BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM-BP-10065) y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Apartado 8: Utilización de la composición del Apartado 6 para la preparación de un medicamento destinado a estimular la inmunidad de las mucosas en una persona que necesita dicha estimulación.

20 Apartado 9: Utilización de la composición del Apartado 7 para la preparación de un medicamento destinado a favorecer la producción de IgA en una persona que necesita dicho tratamiento que favorece la producción de IgA.

Las cepas de bacterias ácido-lácticas de la invención y las composiciones de la invención que contienen las bacterias se describen a continuación.

Cepas de bacterias ácido-lácticas de la invención

25 Las cepas de bacterias ácido-lácticas de la invención se denominan *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM-BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM-BP-10065).

(1) Cribado

(1-1) Procedencia de los microorganismos

30 Los microorganismos utilizados proceden de bacterias ácido-lácticas separadas de contenidos intestinales humanos, de alimentos vegetales y de alimentos animales y conservadas en el Otsu Nutraceuticals Research Institut de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

(1-2) Procedimiento de cribado

35 El cribado de las cepas de bacterias diana se realizó utilizando un sistema de cultivo de las células de los parches de Peyer de ratón utilizando como índice la capacidad de inducir la producción de IgA. Los procedimientos detallados para el cribado son los descritos a continuación en el Ejemplo 2.

(2) Microorganismos obtenidos por cribado

(2-1) *Lactobacillus* ONRIC b0239

(a) Características macroscópicas

(a-1) Medio de agar-agar con MRS

40 Circular a ligeramente irregular, hemiesférica, suave, blanco lechoso.

(a-2) Medio BL con agar-agar

Circular a ligeramente irregular, hemiesférica, suave, blanco lechoso.

(b) Características microscópicas

Bacillus, inmóvil, sin esporas

45 (c) Temperatura óptima de crecimiento

30 a 33°C

(d) Características fisiológicas y bioquímicas

Tinción Gram: positiva

Utilización de azúcar

Glicerol	-
Eritritol	-
D-arabinosa	-
L-arabinosa	-
Ribosa	±
D-xilosa	±
L-xilosa	-
Adonitol	-
β-metil-D-xilósido	-
Galactosa	+
D-glucosa	+
D-fructosa	+
D-manosa	+
L-sorbosa	-
Ramnosa	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Manitol	-
Sorbitol	+
α-metil D-manósido	+
α-metil D-glucósido	±
N-acetil-glucosamina	+
Amigdalina	+
Arbutina	+
Esculina	+
Salicina	+
Celobiosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Melibiosa	+
Sacarosa	+
Trehalosa	+

Inulina	-
Melecitosa	-
D-rafinosa	+
Almidón	-
Glucógeno	-
Xilitol	-
β-genciobiosa	+
D-turanosa	-
D-lixosa	-
D-tagatosa	-
D-fucosa	-
L-fucosa	-
D-arabitol	±
L-arabitol	-
Gluconato	-
2-ceto-gluconato	-
5-ceto-gluconato	-

5 A partir de varias características anteriores, se identificó la cepa obtenida como una cepa de *Lactobacillus plantarum* basándose en los criterios mostrados en el Manual of Systematic Bacteriology de Bergey, y se denominó *Lactobacillus* ONRIC b0239, y se depositó en una corporación administrativa independiente, el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology International Patent Organism Depository, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón el 6 de agosto de 2003, con el número de registro de FERM P-19469. A continuación se transfirió a un depósito internacional bajo el Tratado de Budapest, y recibió un nº de registro de FERM BP-10064.

(2-2) *Lactobacillus* ONRIC b0240

(a) Características macroscópicas

10 (a-1) Medio MRS con agar-agar

Circular a ligeramente irregular, semiesférica, lisa, blanco lechosa

(a-2) Medio BL con agar-agar

Circular a ligeramente irregular, semiesférica, lisa, pardo blanquecina

(b) Características macroscópicas

15 Bacilo, inmóvil, sin esporas

(c) Temperatura óptima de crecimiento

30 a 33°C

(d) Características fisiológicas y bioquímicas

Tinción Gram: positiva

Utilización de azúcar

Glicerol -

Eritritol -

D-arabinosa	-
L-arabinosa	-
Ribosa	±
D-xilosa	-
L-xilosa	-
Adonitol	-
β-metil-D-xilósido	-
Galactosa	+
D-glucosa	+
D-fructosa	+
D-manosa	+
L-sorbosa	-
Ramnosa	-
Dulcitol	±
Inositol	-
Manitol	+
Sorbitol	+
α-metil D-manósido	-
α-metil D-glucósido	-
N-acetil-glucosamina	+
Amigdalina	+
Arbutina	+
Esculina	+
Salicina	+
Celobiosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Melibiosa	+
Sacarosa	+
Trehalosa	-
Inulina	-
Melecitosa	-
D-rafinosa	+
Almidón	-
Glucógeno	-
Xilitol	-

β -genciobiosa	+
D-turanosa	-
D-lixosa	-
D-tagatosa	-
D-fucosa	-
L-fucosa	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Gluconato	-
2-ceto-gluconato	-
5-ceto-gluconato	-

5 La cepa obtenida se identificó a partir de varias características anteriores, como una cepa de *Lactobacillus plantarum* basándose en los criterios mostrados en el Manual of Systematic Bacteriology de Bergey, y se denominó *Lactobacillus* ONRIC b0240, y se depositó en una corporación administrativa independiente, el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology International Patent Organism Depository, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón el 6 de agosto de 2003, con el número de registro de FERM P-19470. A continuación se transfirió a un depósito internacional bajo el Tratado de Budapest, y recibió un nº de registro de FERM BP-10065.

Composición de la invención

10 La composición de la invención comprende esencialmente una cepa de bacterias ácido-lácticas de la invención como ingrediente activo. La composición puede prepararse en forma de alimento, bebida o producto farmacéutico utilizando vehículos comestibles adecuados (materiales alimenticios). La composición puede prepararse además en forma de producto farmacéutico utilizando excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados.

15 La inmunoestimulación notable de las mucosas y el aumento de la producción de IgA conseguidos por la composición de la invención se considera que se producen de la forma siguiente: las células M de los parches de Peyer, que son un constituyente del sistema inmunitario intestinal, absorben un antígeno en el lumen. El antígeno es presentado a los linfocitos CD4 T por las células presentadoras de antígenos tales como los dendrocitos. Mientras que los linfocitos B inmaduros maduran en las células productoras de anticuerpo IgA por respuestas específicas para el antígeno de los linfocitos T, los linfocitos B se desplazan a la lámina propia de la mucosa para diferenciarse por último en las células productoras de anticuerpos IgA. Aunque no está claro cómo las bacterias ácido-lácticas de la invención están implicadas en el mecanismo de aumento de la producción de IgA, por lo menos la absorción del antígeno por las células M de los parches de Peyer es necesaria para el aumento de producción de IgA debido a la presencia de las bacterias de la invención. Por consiguiente, las bacterias ácido-lácticas de la invención se supone que funcionan como dicho antígeno. Para que sean funcionales como antígeno, las bacterias ácido-lácticas de la invención no han de ser células viables. Las bacterias pueden esterilizarse por procedimientos de esterilización con calor convencionales. Sin embargo, dado que la absorción de bacterias ácido-lácticas vivas, generalmente bien conocidas para yogur, etc., es eficaz para el mantenimiento de la salud y la longevidad debido a los efectos sobre la regulación intestinal y el equilibrio de la microflora intestinal y la absorción de bacterias ácido-lácticas vivas de la invención puede esperarse también que tenga estos efectos, las bacterias ácido-lácticas vivas están incorporadas preferentemente en la composición de la invención.

30 Dichas bacterias ácido-lácticas (células viables) pueden estar incorporadas en la composición de la invención, en forma de, por ejemplo, cultivos, productos en bruto o purificados de dichos cultivos y liofilizados de los mismos.

Por lo general, los cultivos pueden obtenerse por un procedimiento que comprende cultivar en un medio adecuado para cada cepa, por ejemplo, medio MRS a 30°C durante aproximadamente 16 horas.

35 Después del cultivo, pueden recuperarse las células, por ejemplo, centrifugando el cultivo a 3.000 rotaciones/minuto a 4°C durante aproximadamente 10 minutos. Éstas pueden purificarse de manera convencional y también pueden liofilizarse. Los liofilizados así obtenidos pueden asimismo utilizarse como ingrediente activo de la composición de la invención.

40 La composición puede enriquecerse con cantidades apropiadas de componentes opcionales, tales como nutrientes, etc., adecuados para el mantenimiento y el desarrollo del microorganismo de la invención, si es necesario. Los ejemplos específicos incluyen los nutrientes utilizados en medios para cultivar microorganismos, por ejemplo, varias

5 fuentes de carbono, tales como glucosa, almidón, sacarosa, lactosa, dextrina, sorbitol, fructosa, etc., fuentes de nitrógeno, tal como peptona, etc., vitaminas; minerales; oligoelementos y otros nutrientes. Los ejemplos de dichas vitaminas incluyen la vitamina B, vitamina D, vitamina C, vitamina E y vitamina K. Los ejemplos de dichos oligoelementos incluyen cinc, selenio, etc. Los ejemplos de otros de dichos nutrientes incluyen varios oligosacáridos, tales como la lactosacarosa, oligosacáridos de soja, lactulosa, lactitol, fructooligosacáridos y galactooligosacáridos. La cantidad de dichos oligosacáridos que debe incorporarse no está particularmente limitada pero se selecciona preferentemente dentro de un intervalo de manera que la concentración de los mismos en la composición de la invención es superior es de aproximadamente 1 a aproximadamente 3% en peso.

10 Las formas específicas para alimentos y bebidas de la composición de la invención incluyen leches fermentadas, bebidas con bacterias ácido-lácticas, bebidas de vegetales fermentados, bebidas de fruta fermentadas y bebidas de leche de soja fermentada. Las expresiones "leche fermentada" y "bebidas de bacterias ácido-lácticas" tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones están en conformidad con las definiciones del Artículo 2-37 "Leche fermentada" y del Artículo 2-38 "Bebida de bacterias ácido-lácticas" de la "Ministerial Ordinance relating to the Ingredients etc. of Milks and Milk Products" del anterior Ministerio Japonés de Salud y Bienestar. Es decir, "leche fermentada" se refiere a una preparación pastosa o líquida preparada fermentando la leche o un producto lácteo con bacterias ácido-lácticas o levaduras. Por consiguiente, "Leche fermentada" incluye no solamente los productos en forma de bebida sino también los productos en forma de yogur. "Bebida de bacterias ácido-lácticas" se refiere a una bebida preparada utilizando como material principal una preparación pastosa o líquida preparada fermentando la leche o un producto lácteo con bacterias ácido-lácticas o levaduras y diluyéndolo con agua.

20 Las bebidas vegetales fermentadas, las bebidas de frutas fermentadas y las bebidas de leche de soja fermentadas son como se describe más adelante en la presente memoria.

25 Otras formas alimenticias de la composición de la invención incluyen las formas microencapsuladas que contienen células, las formas de alimentos sólidos (por ejemplo, gránulos, polvos (incluyendo los polvos anhidros congelados de leche fermentada, etc.), comprimidos, comprimidos efervescentes, gomas, gumi y cremas) y otros productos lácteos aparte de la leche fermentada y de las bebidas con bacterias ácido-lácticas mencionadas anteriormente.

Los ejemplos de formas farmacéuticas incluyen las de administración bucal, por ejemplo, soluciones, emulsiones, gránulos, polvos, cápsulas, comprimidos, etc.

30 El tratamiento en estas formas de alimento o bebida y en las formas farmacéuticas puede realizarse de manera convencional. Los vehículos para su utilización en el tratamiento en dichas formas pueden ser algunos vehículos comestibles, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los detalles del tratamiento y de los vehículos comestibles utilizables para las formas de alimento y de bebida se describen a continuación en el apartado "Formas de alimento y de bebida de las composiciones". Al preparar las formas de alimento, los vehículos particularmente preferidos son los que tienen buen paladar y efectos mejoradores del sabor. El tratamiento en las formas farmacéuticas y los excipientes y diluyentes farmacéuticamente utilizables se describen a continuación en el apartado "Formas farmacéuticas de las composiciones".

40 La cantidad de bacterias ácido-lácticas que debe incorporarse en la composición de la invención pueden seleccionarse de manera adecuada a fin de que consigan una concentración de aproximadamente 10^8 a 10^{11} /100 g de la composición (el recuento de células no es necesariamente el recuento de células viables; cuando está incluido el número de células muertas debería calcularse como el número de bacterias vivas antes de la esterilización; aplicándose así en adelante). El recuento de células viables se determina de la siguiente manera. Se aplica una muestra diluida a un medio de cultivo bacteriano de agar-agar y se cultivan aeróbicamente a 37°C y se realiza el recuento de las colonias formadas. Como el recuento de células viables y de turbidez se correlaciona entre sí, por consiguiente, si esta correlación entre el recuento de células viables y la turbidez se determina de antemano, el recuento de células viables puede calcularse determinando la turbidez en lugar de realizar el recuento de células viables. La cantidad de bacterias ácido-lácticas que deben incorporarse puede ajustarse de manera adecuada según la forma de la composición de la invención que debe prepararse, el tipo de bacterias ácido-lácticas utilizada, etc., utilizando el intervalo mencionado anteriormente como orientación.

50 Dado que la composición de la invención está concebida para que contenga bacterias ácido-lácticas (principalmente células viables), condiciones tales como la aplicación de calor y presión no se recomiendan en el tratamiento de la composición en los productos finales. Por consiguiente, por ejemplo, en el tratamiento de la composición de la invención en formas alimenticias sólidas, resulta preferido formular directamente las bacterias ácido-lácticas en forma de células liofilizadas o tratar las células liofilizadas con un agente de recubrimiento adecuado y utilizar las células recubiertas.

55 Formas de alimento y de bebida de la composición

Las formas de alimento y de bebida representativas preferidas de la composición de la invención incluyen leches fermentadas, bebidas de bacterias ácido-lácticas, bebidas vegetales fermentadas, bebidas de frutos fermentadas, bebidas de leche de soja fermentadas, etc. Las bebidas de vegetales fermentados, las bebidas de frutas fermentadas y

5 las bebidas de leche de soja fermentada se describen con detalle a continuación. El tratamiento en dicha forma puede realizarse por un procedimiento que comprende cultivar bacterias ácido-lácticas y un material de fermentación adecuado que contiene nutrientes para bacterias ácido-lácticas, tal como los fluidos procedentes de vegetales o frutos, leche de soja (emulsión de soja), etc. para de este modo, producir la fermentación del material. Los vegetales y frutos para su utilización como material de fermentación incluyen cortes, triturados, moliendas, jugos exprimidos, productos tratados con enzimas y diluciones y concentraciones de los mismos. Los vegetales utilizables incluyen, por ejemplo, calabazas, zanahorias, tomates, pimientos morrones, apio, espinacas, batatas, maíz, remolachas, col rizada, perejil, berza y brécol. Los frutos utilizables incluyen, por ejemplo, manzanas, melocotones, plátanos, fresas, uvas, melones, naranjas y mandarinas.

10 Los cortes, exprimidos o moliendas de vegetales o frutos pueden obtenerse por ejemplo, por un procedimiento que comprende el lavado de por lo menos un vegetal y/o un fruto y cuando sea necesario, someterlo a un tratamiento de blanqueo, por ejemplo, colocándolo en agua caliente, y a continuación, cortándolo, pulverizándolo o moliéndolo, por medio de un exprimidor, mezclador, procesador de alimentos, pulverizador, Mycolloider™ (producto de Tokushu Kika Kogyo Co. Ltd.) o similar. Los zumos exprimidos pueden prepararse utilizando un filtro prensa, exprimidor-mezclador o similar. Los zumos exprimidos pueden prepararse también filtrando las moliendas a través de un filtro de tela o similar. Los productos tratados con enzimas pueden prepararse dejando que la celulasa, la pectinasa, la protopectinasa o similar actúe en los cortes, exprimidos, moliendas o jugos exprimidos. Las diluciones incluyen diluciones acuosas 1 a 50 veces. Los concentrados incluyen los concentrados 1 a 100 veces por medios tales como la concentración por congelación, la concentración a presión reducida, etc.

20 La leche de soja, que es otro ejemplo específico de material de fermentación, puede prepararse a partir de materiales de soja de manera convencional. Los ejemplos de dichas leches de soja incluyen los homogeneizados preparados sumergiendo semillas de soja peladas en agua, pulverizando en húmedo las semillas de soja con un molino adecuado tal como un molino de coloides y homogeneizando el pulverizado de la manera convencional, y las soluciones en agua de la proteína de soja soluble en agua.

25 Para la fermentación que utiliza bacterias ácido-lácticas, resulta preferido preparar un iniciador de antemano e inocular el material de fermentación con el iniciador. Un ejemplo representativo de dicho iniciador, es un cultivo obtenido inoculando las bacterias ácido-lácticas de la invención en una leche en polvo desnatada al 10% enriquecida con extracto de levadura o un material de fermentación esterilizado de la manera convencional entre 90 y 121°C durante 5 a 20 minutos de antemano e incubando a continuación las bacterias ácido-lácticas de la invención. Un iniciador así preparado contiene normalmente aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 células de bacterias ácido-lácticas de la invención por gramo de cultivo.

30 El material de fermentación utilizado para el iniciador puede enriquecerse opcionalmente con sustancias que favorecen la fermentación, que aseguran el buen desarrollo de las bacterias ácido-lácticas de la invención, por ejemplo, varias fuentes de carbono, tales como glucosa, almidón, sacarosa, lactosa, dextrina, sorbitol, fructosa, etc.; fuentes de nitrógeno, tales como peptona, etc.; vitaminas y minerales.

35 Un inóculo de bacterias ácido-lácticas sería generalmente equivalente a un recuento de células viables no inferior a aproximadamente 1×10^6 , preferentemente aproximadamente 1×10^7 , por centímetro cúbico del fluido de fermentación. En cuanto a las condiciones de cultivo, la temperatura de fermentación se selecciona generalmente en el intervalo entre aproximadamente 20 y aproximadamente 45°C, y preferentemente aproximadamente 25 a aproximadamente 37°C, y el tiempo de fermentación se selecciona en el intervalo entre aproximadamente 5 y aproximadamente 72 horas.

40 El producto de la fermentación del ácido láctico así obtenido puede estar en forma cuajada (una forma similar al yogur o similar a la crema) y dicho producto puede ingerirse directamente como un alimento sólido. Dicho producto de fermentación de ácido láctico en forma cuajada puede homogeneizarse más para preparar una forma de bebida deseada. Esta homogeneización puede realizarse utilizando un homogeneizador corriente. Más específicamente puede realizarse utilizando un homogeneizador (LAB 40) a alta presión de Gaulin a aproximadamente 200 hasta aproximadamente 1.000 kgf/cm², y preferentemente aproximadamente 300 a aproximadamente 800 kfg/cm², o un homogeneizador de Sanwa Machine Industry Co., (números del producto: HA x 4571, H2O-A2, etc.) a no menos de 150 kg/cm². Mediante dicha homogeneización, puede obtenerse un producto de bebida con excelente sensación en el paladar, y particularmente una sensación suave en la boca. Al llevar a cabo la homogeneización, es posible también, si es necesario, hacer diluciones apropiadas, añadir ácidos orgánicos para ajuste de pH, y/o añadir en cantidades adecuadas otros varios aditivos como los que se emplean por lo general en la preparación de bebidas, tales como sacáridos en zumos de fruta, espesantes, tensioactivos y aromatizantes. Los aditivos preferidos y sus cantidades (% en peso referido al peso del producto de la fermentación de la forma cuajada) son, por ejemplo, 8% de glucosa (% en peso, lo mismo se aplica a continuación), 8% de sacarosa, 8% de dextrina, 0,1% de ácido cítrico, 0,2% de ésteres de ácido graso de glicerol y 0,1% de aromatizantes .

55 La bebida de la invención así obtenida puede distribuirse asépticamente en los recipientes adecuados para proporcionar los productos finales. Los productos tienen buena sensación en el paladar permitiendo una digestión suave y buen sabor agradable.

La cantidad administrada (cantidad admitida) del producto puede seleccionarse de manera adecuada según la edad, sexo, peso corporal y gravedad de la enfermedad del receptor, etc., y no está específicamente limitada. Generalmente, un producto con un recuento viable de aproximadamente 10^6 a 10^{10} células/ml puede administrarse a un cuerpo humano a una cantidad admitida de aproximadamente 50 a 1.000 ml/día.

5 Otro ejemplo específico de la composición de la invención en forma de alimento es la composición en forma de un producto efervescente. Este producto puede prepararse formulando 10 a 35% (% en peso; aplicándose así a continuación) de carbonato sódico y/o de bicarbonato sódico y 20 a 70% de un neutralizante, como ingredientes efervescentes, con 0,01 al 50% de bacterias ácido-lácticas (células liofilizadas) de la invención. El neutralizante utilizado es un compuesto ácido capaz de neutralizar el carbonato sódico y/o el bicarbonato sódico para generar gas dióxido de carbono. Los ejemplos representativos de dichos compuestos son los ácidos orgánicos tales como el ácido L-tartárico, ácido cítrico, ácido fumárico y ácido ascórbico.

10 La cantidad de ingredientes efervescentes en el producto efervescente de la invención es tal que cuando este producto de la invención se disuelve en agua, la solución es ácida, particularmente una acidez de aproximadamente pH 3,5 a 4,6. Más específicamente, la cantidad puede seleccionarse de entre el intervalo de 10 al 35% de carbonato sódico y/o bicarbonato sódico y 20 al 70% de neutralizante. En particular, la cantidad de carbonato sódico puede seleccionarse de entre el intervalo entre 11 y 31%, y preferentemente entre 22 y 26%; y/o bicarbonato sódico de entre el intervalo de 10 al 35%, y preferentemente del 20 al 30%. Resulta todavía más preferido utilizar bicarbonato sódico solo, en el intervalo del 20 al 25%. La cantidad de neutralizante se selecciona de entre el intervalo del 20 al 70%, y preferentemente del 30 al 40%. En particular, resulta todavía más preferido utilizar ácido L-tartárico en el intervalo entre el 20 y el 25% y ácido ascórbico en el intervalo entre 8 y 15%.

15 El producto efervescente de la invención contiene bacterias ácido-lácticas de la invención e ingredientes efervescentes como componentes esenciales y pueden enriquecerse opcionalmente con cantidades adecuadas de varios aditivos conocidos tales como excipientes, aglutinantes, disgregadores, lubricantes, espesantes, tensioactivos, osmorreguladores, electrolitos, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, reguladores del pH y demás. Los ejemplos de dichos aditivos incluyen almidones tales como almidón de trigo, almidón de patata, almidón de maíz, dextrina, etc.; azúcares tales como sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, lactosa, etc.; alcoholes de azúcar tales como sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, etc.; glucósidos tales como azúcar de acoplamiento, palatinosa, etc.; excipientes tales como fosfato cálcico, sulfato cálcico, etc.; aglutinantes y espesantes tales como almidones, azúcares, gelatina, goma arábiga, dextrina, metilcelulosa, polividona, alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, goma de xantano, pectina, goma tragacanto, caseína, ácido alginico, etc.; lubricantes tales como leucina, isoleucina, L-valina, ésteres de azúcar, aceites hidrogenados, ácido esteárico, estearato de magnesio, talco, macrogoles, etc.; disgregadores tales como celulosa cristalina (denominación comercial "Avicel" producto de Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), carboximetilcelulosa (CMC), carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na), carboximetilcelulosa de calcio (CMC-Ca), etc.; tensioactivos tales como éster de ácido graso de polioxietileno sorbitan (polisorbato), lecitina, etc.; dipéptidos tales como aspartamo, alitamo, etc.; y edulcorantes tales como stevia, sacarina, etc. Dichos aditivos pueden seleccionarse de manera adecuada y utilizarse en cantidades adecuadas teniendo en consideración la relación de cada uno de los componentes esenciales, la naturaleza de la preparación y el procedimiento de producción de la preparación entre otros factores.

20 Además, pueden añadirse vitaminas, particularmente cianocobalamina y ácido ascórbico (vitamina C) en cantidades apropiadas al producto efervescente de la invención. La cantidad no está limitada específicamente, pero la vitamina C, por ejemplo, se añade habitualmente hasta el 30% como máximo, y preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 25%.

25 El procedimiento de producción del producto efervescente de la invención puede ser fundamentalmente similar a los procedimientos convencionales para la producción de comprimidos efervescentes de este tipo. Por lo tanto, producto de la invención en forma de comprimido efervescente puede prepararse pesando cantidades predeterminadas de los ingredientes respectivos, mezclándolos y tratando el conjunto, por ejemplo, por el procedimiento de compresión directa del polvo o por el procedimiento de granulación-compresión en húmedo o en seco.

30 El producto de la invención así obtenido puede convertirse en una forma de bebida apropiada para la administración oral simplemente colocándose en agua y administrándose por vía oral.

35 La cantidad administrada (cantidad admitida) de la misma no está específicamente limitada y puede decidirse de manera adecuada según la edad, el sexo, el peso corporal, la gravedad de la enfermedad del receptor entre otras variables. Generalmente, 1 a 2 comprimidos de la forma de comprimido efervescente de la invención que pesa 1,5 a 6,0 g por comprimido se disuelven en 100 a 300 ml de agua y se administran en una sola dosis a un receptor humano.

Formas farmacéuticas de la composición

40 La composición de la invención puede formularse en productos farmacéuticos generales utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados junto con como componente esencial las bacterias ácido-lácticas de la invención y ponerse en práctica. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables utilizables incluyen varios diluyentes y excipientes tales como cargas, dispersantes, aglutinantes, humectantes, disgregadores, tensioactivos, lubricantes, etc. que son conocidos en la técnica. Dichos vehículos pueden utilizarse selectivamente según la forma de

dosis unitaria de la preparación farmacéutica que va a crearse.

La forma de dosis unitaria del producto farmacéutico puede seleccionarse de entre varias formas de dosificación. Las formas representativas son comprimidos, píldoras, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas.

5 Pueden prepararse comprimidos utilizando vehículos farmacéuticos, por ejemplo, excipientes tales como lactosa, sacarosa, cloruro sódico, glucosa, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico, fosfato potásico, etc.; aglutinantes tales como agua, etanol, propanol jarabe simple, soluciones de glucosa, soluciones de almidón, soluciones de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, polividona, etc.;
 10 disgregadores tales como carboximetilcelulosa (CMC), carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa cálcica, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, almidón anhidro, alginato sódico, agar-agar en polvo, laminaran en polvo, bicarbonato sódico, carbonato cálcico, etc.; tensioactivos tales como los ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitan, laurilsulfato sódico, monoglicérido de ácido esteárico, etc.; inhibidores de disgregación tales como sacarosa, estearina, manteca de cacao, aceites hidrogenados, etc.; activadores de absorción tales como las sales de amonio cuaternario, laurilsulfato sódico, etc.; humectantes tales como glicerol, almidón, etc.; adsorbentes tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita, sílice coloidal, etc.; y lubricantes tales como talco purificado, estearatos, ácido bórico en polvo, polietilenglicol, etc.

Además, si es necesario, los comprimidos pueden estar recubiertos con un material de revestimiento convencional para proporcionar comprimidos recubiertos con azúcar, comprimidos recubiertos de gelatina, comprimidos entéricos recubiertos, comprimidos recubiertos de película, etc., o tratados en comprimidos con multicapa tales como los comprimidos con doble capa.

Pueden prepararse píldoras utilizando vehículos farmacéuticos, por ejemplo, excipientes tales como glucosa, lactosa, almidón, manteca de cacao, aceites vegetales hidrogenados, talco, etc.; aglutinantes tales como goma arábiga en polvo, goma tragacanto en polvo, gelatina, etanol, etc.; y disgregadores tales como laminaran, agar-agar, etc.

Además, si es necesario, pueden incorporarse agentes colorantes, conservantes, productos químicos aromáticos, aromatizantes, edulcorantes y otras sustancias medicinales en el producto farmacéutico de la invención.

La cantidad de bacterias del ácido láctico de la invención que debe incorporarse en el producto farmacéutico de la invención no está particularmente limitada y puede seleccionarse de manera adecuada de entre un amplio intervalo. La proporción generalmente recomendada es de aproximadamente 10^7 a 10^{12} células/forma de dosificación unitaria del producto farmacéutico.

30 El procedimiento de administración del producto farmacéutico no está particularmente limitado y puede decidirse adecuadamente según la forma del producto farmacéutico, la edad del paciente, el sexo y otras variables, la gravedad de la enfermedad, etc. Por ejemplo, se administran por vía oral comprimidos, píldoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas.

35 La dosis del producto farmacéutico puede seleccionarse de manera adecuada según el método de administración, la edad del paciente, el sexo y otras variables, la gravedad de la enfermedad, etc. pero preferentemente es de aproximadamente 0,5 a 20 mg/día de bacterias ácido-lácticas de la invención, es decir, el ingrediente activo, por kg de peso corporal. El producto farmacéutico puede administrarse en 1 a 4 dosis divididas al día.

40 La composición de la invención está tan adaptada que, en la toma (administración) las bacterias ácido-lácticas de la composición sedimentan en el aparato digestivo inferior como parte de la microflora intestinal, por lo que pueden conseguirse efectos de las bacterias ácido-lácticas tales como la regulación intestinal y la mejora de la microflora intestinal. Por consiguiente, una forma de producto farmacéutico particularmente preferido son los comprimidos entéricos revestidos, mediante los cuales las bacterias ácido-lácticas pueden transportarse al intestino sin ser atacadas por el ácido gástrico.

45 Las cepas de bacterias ácido-lácticas de la invención y las composiciones que contienen las bacterias pueden estimular la inmunidad de la mucosa humana y estimular la producción de IgA en la toma o administración de la misma. La presente invención proporciona así un procedimiento de estimulación de la inmunidad de la mucosas en un paciente humano necesitado de dicha estimulación que comprende administrar a dicho paciente humano las bacterias ácido-lácticas de la invención; un procedimiento de estimulación de la inmunidad de las mucosas en un paciente humano necesitado de dicha estimulación que comprende administrar a dicho paciente humano la composición de la invención;
 50 un procedimiento de estimulación de la producción de IgA en un paciente humano necesitado de dicho tratamiento de estimulación de la producción de IgA que comprende administrar a dicho paciente humano las bacterias ácido-lácticas de la invención, y un procedimiento de estimulación de la producción de IgA en un paciente humano necesitado de dicho tratamiento que favorece la producción de IgA que comprende administrar a dicho paciente humano la composición de la invención.

55 La presente invención proporciona además la utilización de las bacterias ácido-lácticas de la invención para la inmunoestimulación de las mucosas humanas; la utilización de la composición de la invención para la inmunoestimulación de las mucosas humanas, la utilización de las bacterias ácido-lácticas de la invención para

favorecer la producción de IgA humana; y la utilización de la composición de la invención para favorecer la producción de IgA humana.

Además, la presente invención proporciona la utilización de las bacterias ácido-lácticas de la invención para preparar la composición de la invención.

5 **EFFECTOS DE LA INVENCION**

10 La presente invención proporciona bacterias ácido-lácticas que tienen excelentes capacidades para inducir la producción de IgA y son eficaces para proporcionar la inmunestimulación de las mucosas humanas mejorada, particularmente la inmunestimulación intestinal y reforzando el sistema de defensas del hospedador, y se proporcionan composiciones que contienen las bacterias, más específicamente las composiciones en forma de alimentos o productos farmacéuticos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama que presenta los efectos de la administración de las bacterias ácido-lácticas de la invención sobre la producción de IgA de las células de los parches de Peyer.

15 La figura 2 es un gráfico que muestra la influencia de la administración de las bacterias ácido-lácticas de la invención sobre la producción de IgG.

MEJOR MODO DE PONER EN PRACTICA LA INVENCION

Los siguientes ejemplos y ejemplos de ensayo se proporcionan para describir la invención con mayor detalle.

EJEMPLO 1

Los ejemplos de formulación de la composición de la invención se muestran a continuación.

20 **(1) Preparación de bebida de leche de soja fermentada**

Se pesan los ingredientes según la receta siguiente y se mezclan para preparar una composición de la invención en forma de bebida.

Leche de soja fermentada por <i>Lactobacillus</i> ONRIC b0239	100 ml
Lactosacarosa (55% de contenido)	10,0 g
Vitaminas y minerales	c.s.p.
Aromatizante	c.s.p.
Agua	c.s.p.
Total	150 ml

25 La leche de soja fermentada por *Lactobacillus* ONRIC b0239 se obtuvo añadiendo 10^8 células de *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM BP-10064) a 1 litro de leche de soja (contenido en proteínas aproximadamente 5 g/100 ml) y llevando a cabo la fermentación a 37°C durante 48 horas. El contenido de células bacterianas de la leche fermentada fue de 1×10^9 células/ml.

(2) Preparación de leche de vaca fermentada

Se pesaron los ingredientes según la siguiente receta y se mezclaron para preparar una composición de la invención en forma de leche de vaca fermentada.

Lactosacarosa (55% de contenido)	10,0 g
Leche de vaca fermentada por <i>Lactobacillus</i> ONRIC b0240	100 ml
Vitaminas y minerales	c.s.p.
Aromatizante	c.s.p.
Agua	c.s.p.
Total	150 ml

La leche de vaca fermentada por *Lactobacillus* ONRIC b0240 se obtuvo añadiendo 10^8 células de *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM BP-10065) a 1 litro de leche de vaca y realizando la fermentación a 37°C durante 24 horas. El contenido en células bacterianas de la leche fue de 1×10^8 células/ml.

(3) Preparación de leche de vaca en polvo fermentada y liofilizada

5 Utilizando aproximadamente 10^7 células de *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM BP-10064), se sometieron 100 g de leche de vaca a fermentación con ácido láctico a 37°C durante 24 horas, seguido de liofilización del producto de fermentación (incluyendo las bacterias) para preparar un polvo.

10 El polvo resultante y varios otros ingredientes se pesaron según la siguiente receta y se mezclaron para preparar una composición de la invención en forma de polvo liofilizado o leche de vaca fermentada. El contenido en células bacterianas del polvo fue de 1×10^9 células/g.

Polvo liofilizado de <i>Lactobacillus</i> ONRIC	
Leche de vaca fermentada con b0239	2,2 g
Excipiente	c.s.p.
Vitaminas y minerales	c.s.p.
Aromatizante	c.s.p.
Total	20 g

Se utilizó almidón de maíz como excipiente.

(4) Preparación de un polvo

Se pesaron los ingredientes según la siguiente receta y se mezclaron para preparar un compuesto de la invención en forma polvo.

Caseína	4,5 g
Lactosacarosa (55% de contenido)	10,0 g
<i>Lactobacillus</i> ONRIC b0240 en polvo liofilizado	1,0 g
Vitaminas y minerales	c.s.p.
Aromatizante	c.s.p.
Total	20 g

15 El polvo liofilizado de *Lactobacillus* ONRIC b0240 se obtuvo cultivando *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM BP-10065) a 37°C durante 24 a 48 horas en una solución acuosa de crema de leche, es decir, un material de fermentación para cultivar el *Lactobacillus*, seguido de liofilización. El contenido de células bacterianas del polvo fue de 10^9 a 10^{10} células/g.

(5) Preparación de gránulos

20 Se pesaron los ingredientes según la siguiente receta y se mezclaron para preparar una composición de la invención en forma granular.

Lactosacarosa (55% de contenido)	10,0 g
<i>Lactobacillus</i> ONRIC b0240 en polvo liofilizado	1,0 g
Sorbitol	c.s.p.
Vitaminas y minerales	c.s.p.
Aromatizante	c.s.p.
Total	20 g

El *Lactobacillus* ONRIC b0240 liofilizado en polvo utilizado fue el mismo que en Ejemplo 1-(4).

(6) Microcápsulas que contienen *Lactobacillus*

Se liofilizó *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM BP-10064) de la misma manera que en el ejemplo 1-(4) y 6×10^{10} células/g y el polvo liofilizado resultante se dispersó junto con lactosacarosa en un producto fundido de aceite de coco deshidrogenado (punto de fusión: 34°C) para preparar una mezcla fundida de bacterias ácido-lácticas (25%), aceite (70%) y oligosacárido (5%). El producto fundido resultante se añadió gota a gota a un aceite fluido enfriado a través de la boquilla más interna de una boquilla triple concéntrica a un caudal medio de 0,3 m/s; una mezcla fundida de aceite de coco hidrogenado (punto de fusión: 43°C) y aceite de soja hidrogenado se añadió a través de la boquilla intermedia, alrededor de la boquilla más interna, a un caudal medio de 0,3 m/s; y una solución de gelatina/pectina (85/15 v/v) para formar carcasas de cápsulas se añadió a través de la boquilla más externa a un caudal medio de 0,3 m/s para producir cápsulas sin las irregularidades de la triple capa ($1,4 \times 10^9$ células/g de la cápsula) con un diámetro de 2,5 mm.

La relación en peso de los contenidos internos, el revestimiento intermedio y la carcasa externa de la cápsula fue 35:35:30.

Las cápsulas se secaron con aire y se sometieron a secado al vacío o liofilización al vacío para reducir la actividad de agua de las cápsulas a un valor A_w de 0,20 o menos y la conductividad térmica a 0,16 kcal/mh°C o inferior. El valor A_w se determinó utilizando el medidor de la actividad del agua de tipo resistencia eléctrica (medidor A_w , WA-360, producto de Shibaura Electronics Co., Ltd.). La conductividad térmica se midió por el método de Fitch.

EJEMPLO 2

En este ejemplo, se determinaron *in vitro* las capacidades de inducción de la producción de IgA de las bacterias ácido-lácticas de la invención utilizando un sistema de cultivo células de los parches de Peyer según los procedimientos descritos en Yasui *et al.*, e Ikenaga *et al.* [Yasui, H. *et al.*, *Microbial Ecology in Heart and Disease*, 5, 155 (1992); Ikenaga, T. *et al.*, *Milk Science*, 51, 27 (2002)]. Los procedimientos de ensayo son los siguientes:

(1) Animales experimentales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa endogámica SPF/VAF BALB/c AnNCrj.

Los ratones del ensayo obtenidos se pusieron en cuarentena durante una semana. Durante el periodo de cuarentena, se suministró a discreción una dieta sólida MF (producto de Oriental Yest Co., Ltd.) y agua del grifo.

(2) Método de cultivo de células de los parches de Peyer

Después del período de cuarentena, 80 ratones se dividieron en 8 grupos de 10 ratones cada uno de tal manera que el peso corporal medio de cada grupo era esencialmente el mismo. Después del agrupamiento, se sacrificaron diez ratones cada día para extraer el intestino delgado y disecar los parches de Peyer del intestino delgado. Los parches de Peyer se enfriaron con hielo en un tubo de centrifugadora que contenía MEM [MEM de Eagle (producto de NISSUI), glutamina 2 mM (producto de GIBCO), piruvato sódico 1 mM (producto de GIBCO), y aminoácidos no esenciales de MEM (producto de GIBCO)]. Las células se pasaron a través de una malla para preparar una suspensión regular única y se lavaron bien con 5 ml de MEM. La suspensión celular se filtró y se centrifugó a 4°C a 1.000 revoluciones/minuto durante 10 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante del cultivo se retiró por aspiración y el precipitado se puso en suspensión en 5 ml de MEM. Una vez se había repetido dos veces este procedimiento, el precipitado se puso en suspensión en 10 ml de MEM que contenía FBS al 5% (producto de GIBCO), y se hizo el recuento de células viables de los parches de Peyer. La suspensión celular se inoculó en una placa de 96 pocillos para preparar una placa de cultivo celular.

(3) Preparación de las células de ensayo

Se utilizaron *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM BP-10065) como bacterias ácido-lácticas de la invención. Estas bacterias se cultivaron en medios adecuados para su cultivo hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario y los cultivos resultantes se centrifugaron a continuación a 7.000 g durante 10 minutos (4°C). Se lavaron las células tres veces con PBS(-) y se pusieron en suspensión en 5 ml de solución salina fisiológica. Para determinar el recuento de células, se midió la turbidez a 660 nm. Las células se esterilizaron a continuación al autoclave a 100°C durante 30 minutos. Una turbidez de 1,0 a 660 nm se determinó que era equivalente a $2,0 \times 10^9$ células/ml.

(4) Determinación de la concentración de IgA en sobrenadantes de cultivo

Las células de los parches de Peyer preparadas anteriormente en el apartado (2) anterior se pusieron en suspensión en MEM que contenía 5% de FBS y se ajustaron a $2,5 \times 10^6$ células/ml, y se inocularon 200 µl de la suspensión en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Se añadieron a cada pocillo de la placa porciones de veinte µl de la suspensión celular de ensayo a una concentración de $2,0 \times 10^9$ células/ml preparadas anteriormente en el apartado (3) y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 7 días.

Se utilizaron veinte µl de LPS (lipopolisacárido) a una concentración de 50 µg/ml como referencia positiva en

lugar de 20 µl de las células anteriores.

Posteriormente, las concentraciones totales de IgA de los sobrenadantes del cultivo resultantes se determinaron por ELISA utilizando un kit disponible en el mercado.

(5) Actividad que aumenta la producción de IgA de bacterias ácido-lácticas de la invención

- 5 La Tabla 1 a continuación muestra la actividad que aumenta la producción de IgA de bacterias ácido-lácticas de la invención en cuanto al índice de estimulación (S.I.), es decir, las concentraciones totales de IgA de sobrenadantes que contienen bacterias ácido-lácticas de la invención tal como se determinó anteriormente en el apartado (4) en relación con la de un sobrenadante de cultivo de referencia preparado añadiendo 10 µl de PBS(-) a MEM y cultivando el medio exento de células de manera similar durante 7 días como referencia (1.0).
- 10 Los resultados del ensayo utilizando varias bacterias ácido-lácticas conocidas se muestran en las Tablas 1 a 4. Los resultados del ensayo de la referencia positiva (LPS 50 µg/ml) se indican como "referencia positiva (LPS)". Las abreviaturas bajo "cepa nº" en las Tablas indican los depositarios de microorganismos siguientes:
- ATCC: American Type Culture Collection; Manassas, VA, US
- JCM: Japan collection of Microorganism, The Institute of Physical and Chemical Research , RIKEN.
- 15 NRIC: NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japón.

Tabla 1

Cepa nº	Género	Especie	Subesp.	IgA S.I.
	Referencia (PBS)			1
	Referencia positiva (LPS)			13,1
ONRIC b0239	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		5,61
ONRIC b0240	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		6,31
JCM 1132	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>		1,15
ATCC 43121	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>		1,1
JCM 1059	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1,2
JCM 1115	<i>Lactobacillus</i>	<i>buchneri</i>		1,17
JCM 1134	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1,03
JCM 1096	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1,63
JCM 1002	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>bulgaricus</i>	1,23
JCM 1012	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>delbrueckii</i>	1,41
JCM 1248	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>lactis</i>	1,31
JCM 1173	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,08
JCM 1131	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>		1,15
JCM 1155	<i>Lactobacillus</i>	<i>hilgardii</i>		1,11
JCM 2012	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>		1,11
JCM 8572	<i>Lactobacillus</i>	<i>kefirgranum</i>		1,08
JCM 5818	<i>Lactobacillus</i>	<i>kefiri</i>		1,21
JCM 8130	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	1,11
JCM 1171	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1,11
JCM 1149	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,66

JCM 1551	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,14
JCM 8341	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,18
JCM 1112	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		1,15
ATCC 7469	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>		1,05
JCM 1157	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>	<i>sakei</i>	1,52
JCM 1150	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	<i>salicinius</i>	1,06
JCM 1231	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	<i>salivarius</i>	1,14
JCM 9504	<i>Lactobacillus</i>	<i>suebicus</i>		1,28
JCM 5885	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	<i>(pentosaceus)</i>	1,51
JCM 5890	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1,44
JCM 6124	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	1
NRIC 0103	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>		1,06
NRIC 0110	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>		1,08
NRIC 0134	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1,07

Tabla 1 (Continuación)

Cepa nº	Género	Especie	Subesp.	IgA S.I.
NRIC 0137	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1,13
NRIC 1713	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1,08
NRIC 1950	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1,12
NRIC 1964	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1,07
NRIC 1965	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>		1,07

Tabla 2

Cepa nº	Género	Especie	Subesp.	IgA S.I.
NRIC 1042	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1,00
NRIC 1597	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	0,96
NRIC 1917	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1,01
NRIC 1941	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1,02
NRIC 1962	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1,00
NRIC 1963	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1,05
NRIC 1968	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	<i>casei</i>	1,07
NRIC 1975	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1,02
NRIC 1976	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1,14
NRIC 1977	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1,04
NRIC 1978	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		1,11
NRIC 1979	<i>Lactobacillus</i>	<i>curvatus</i>		0,99

NRIC 0191	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>bulgaricus</i>	1,07
NRIC 1682	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>lactis</i>	1,12
NRIC 0129	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,00
NRIC 0131	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,19
NRIC 0132	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,03
NRIC 0135	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,02
NRIC 0139	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,14
NRIC 0141	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,08
NRIC 0142	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		0,94
NRIC 0143	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,04
NRIC 0144	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		0,97
NRIC 0145	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,09
NRIC 0146	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,05
NRIC 0147	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,05
NRIC 1949	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,09
NRIC 1952	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,06
NRIC 1955	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		1,12
NRIC 1966	<i>Lactobacillus</i>	<i>hilgardii</i>		0,94
NRIC 1967	<i>Lactobacillus</i>	<i>hilgardii</i>		1,06
NRIC 1936	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0,96
NRIC 1937	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0,94
NRIC 1942	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0,93
NRIC 1944	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	1,00
NRIC 1945	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	0,98
NRIC 1946	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	1,01
NRIC 1934	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1,09
NRIC 1935	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1,03
NRIC 1938	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1,03

Tabla 3

Cepa nº	Género	Especie	Subesp.	IgA S.I.
NRIC 1939	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1,01
NRIC 1940	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	1,01
NRIC 1943	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	0,99
NRIC 1947	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	<i>tolerans</i>	0,98

ES 2 356 315 T3

NRIC 0391	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>		1,00
NRIC 0392	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>		1,04
NRIC 0393	<i>Lactobacillus</i>	<i>oentosus</i>		1,19
NRIC0394	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>		1,15
NRIC 1919	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,32
NRIC 1920	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,08
NRIC 1921	<i>Lactobacillus</i>	<i>p/antarum</i>		1,14
NRIC 1922	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,37
NRIC 1923	<i>Lactobacillus</i>	<i>p/antarum</i>		0,96
NRIC 1957	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,01
NRIC 1958	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>		1,31
NRIC 1715	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		0,95
NRIC 1974	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		1,16
NRIC 1980	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>		1,31
NRIC 1599	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		0,97
NRIC 1600	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1,52
NRIC 1601	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1,07
NRIC 1602	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1,37
NRIC 1603	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i>		1,03
NRIC 1575	<i>Leuconostoc</i>	<i>Jactis</i>		0,85
NRIC 1576	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		0,92
NRIC 1578	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		1,00
NRIC 1580	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		1,03
NRIC 1582	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		0,93
NRIC 1750	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>		1,03
NRIC 1087	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	1,33
NRIC 1507	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	1,02
NRIC 1541	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	0,90
NRIC 0124	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>		0,93
NRIC 0122	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1,03
NRIC 0123	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		0,96
NRIC 1913	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1,62
NRIC 1914	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1,05
NRIC 1915	<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>		1,28

NRIC 0001	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,04
NRIC 0002	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,02
NRIC 0004	<i>Saccharomvces</i>	<i>Cerevisiae</i>		1,12

Tabla 4

Cepa nº	Género	Especie	Subesp.	IgA S.I.
NRIC 0005	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,00
NRIC 0006	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,01
NRIC 0007	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,98
NRIC 0008	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,97
NRIC 0009	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,98
NRIC 0011	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,03
NRIC 0013	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,95
NRIC 0014	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,94

Tabla 4 (Continuación)

Cepa nº	Género	Especie	Subesp.	IgA S.I.
NRIC 0015	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,04
NRIC 0016	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,88
NRIC 0059	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,12
NRIC 0060	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,11
NRIC 1412	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,00
NRIC 1414	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,03
NRIC 1415	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,85
NRIC 1417	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,97
NRIC 1461	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,92
NRIC 1465	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,00
NRIC 1466	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,07
NRIC 1624	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,91
NRIC 1478	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,91
NRIC 1482	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,94
NRIC 1483	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,24
NRIC 1484	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,87
NRIC 1485	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,95
NRIC 1486	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,04
NRIC 1487	<i>Saccharomvces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,91

NRIC 1488	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,91
NRIC 1489	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,84
NRIC 1490	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		0,88
NRIC 1811	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>		1,03

Como se muestra en las Tablas 1 a 4, considerando como 1 la producción de IgA de la referencia PBS, el S.I. del medio de la referencia positiva era 13,1, lo que indica un fuerte aumento de la producción de IgA. Se confirmó de este modo que este sistema de cultivo era útil para evaluar la producción de IgA de las células de los parches de Peyer.

5 Una comparación de varias bacterias ácido-lácticas en cuanto a las capacidades de inducción de la producción de IgA indica que las bacterias ácido-lácticas de la invención, *Lactobacillus* ONRIC b0239 y *Lactobacillus* ONRIC b0240, tienen valores de S. I. de 5,61 y 6,31 respectivamente, y de este modo tienen capacidades inducción de la producción de IgA notablemente superior en comparación con otras cepas, cuyos valores de S. I. son 0,8-1,4.

La IgA inhibe la invasión bacteriana patógena, neutraliza los virus y toxinas, e inhibe la invasión de alérgenos alimenticios. El aumento de dicho IgA es importante para la defensa del hospedador.

10

EJEMPLO 3

En este Ejemplo, se determinaron *in vivo* las capacidades de inducción de la producción de IgA de las bacterias ácido-lácticas de la invención de la manera siguiente.

(1) Animales experimentales y su alimentación

15 Se adquirieron cincuenta ratones macho BALB/c de 8 semanas de vida y se aislaron durante una semana. Durante el periodo de aislamiento y el periodo de prueba posterior, se suministró a discreción una dieta sólida de MF (producto de Oriental Yest Co., Ltd.) y agua del grifo.

20 Después del período de cuarentena, los ratones se dividieron en 3 grupos, es decir, un grupo de administración de solución salina fisiológica (15 ratones), un grupo de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células viables) (15 ratones) y un grupo de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables) (15 ratones).

(2) Preparación de bacterias ácido-lácticas de la invención para administración oral

Se prepararon bacterias ácido-lácticas de la invención (células viables e inviables) para administración oral por los procedimientos siguientes.

Células viables

25 Se cultivó *Lactobacillus plantarum* b0240 (FERM BP-10065; denominada en adelante "b0240") en un medio MRS hasta que se alcanzó la fase de crecimiento estacionario y el cultivo resultante se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 minutos (4°C). Las células se sometieron a lavado de centrifugadora con solución salina fisiológica dos veces y se pusieron en suspensión en solución salina fisiológica para conseguir una concentración de 4×10^9 UFC/ml.

Células inviables

30 La suspensión de células viables obtenidas de este modo se introdujo en el autoclave (calentado a 121°C durante 15 minutos) y a continuación se sometió a ultrasonidos utilizando un sonicador de lavado (BRANSON 2510) durante 45 minutos.

(3) Procedimiento de ensayo

35 Las bacterias ácido-lácticas (células viables) de la invención preparadas en el apartado (2) se administró por vía oral a 15 ratones (5 + 5 + 5 = 15 ratones) del grupo de administración de las bacterias ácido-lácticas de la invención (células viables) durante 7 días (5 ratones), 14 días (5 ratones) o 21 días (5 ratones) cada mañana en una cantidad de 10^9 UFC/250 μ l/ratón/día. Asimismo, las bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables) preparadas en el apartado (2) se administraron por vía oral a 15 ratones del grupo de administración de las bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables) durante 7 días (5 ratones), 14 días (5 ratones) o 21 días (5 ratones). Después de sus respectivos periodos de administración, los ratones de cada grupo se sacrificaron por decapitación para extraer su sangre en tubos, que se centrifugó a 4°C a 3.000 rotaciones/minuto durante 10 minutos para obtener sueros. Se prepararon células de los parches de Peyer por el procedimiento siguiente. Después de sacrificar los ratones en cada grupo, se extirpó el intestino delgado y se diseccionó con tijeras oftalmológicas para eliminar los parches de Peyer del intestino delgado. Se enfriaron los parches de Peyer con hielo en una placa de microvaloración de 24 pocillos que contenía un medio incompleto (RPMI 1640 que contenía 10 mg de Gentamicina). El cultivo resultante se pasó a través de una malla para preparar una suspensión celular individual y se lavó bien con 5 ml del medio incompleto. La

suspensión celular obtenida se filtró y se centrifugó a 4°C a 1.000 revoluciones/minuto durante 10 minutos. Tras la centrifugación, el sobrenadante del cultivo se eliminó por aspiración y el precipitado se puso en suspensión en 5 ml del medio incompleto. Una vez el procedimiento anterior consistente en lavado, filtración, centrifugación y eliminación por aspiración del sobrenadante de cultivo, se repitió una vez, se utilizó el precipitado resultante como células de los parches de Peyer.

Los ratones de referencia (15 ratones) en el grupo con administración de solución salina fisiológica se alojaron sin administrarles las bacterias ácido-lácticas (células viables e inviables) de la invención, y sus sueros y las células de los parches de Peyer se prepararon de la misma manera que anteriormente, 7 días (5 ratones), 14 días (5 ratones) o 21 días (5 ratones) después del comienzo del ensayo.

10 Ensayo de producción de IgA

Las células de los parches de Peyer (precipitados) así preparadas se pusieron en suspensión en 0,5 ml de un medio completo (RPMI1640 que contiene L-glutamina 2 mM, mercaptoetanol 50 µM, 100 U/ml de penicilina, 100 ml/ml de estreptomina y 10% de FBS) y se ajustaron para conseguir una concentración celular de 2×10^6 células/ml. Una vez se hizo el recuento del número de células viables, se inocularon 100 µl, de porciones de las suspensiones celulares en cada pocillo de una placa de cultivo de células de 96 pocillos.

La cantidad de IgA producida por las células de los parches de Peyer se evaluó por dos métodos, es decir, un método que comprende células de los parches de Peyer de cultivo tal como están y midiendo la cantidad de IgA producida, y un método que comprende cultivar las células de los parches de Peyer en un sistema de cultivo que contiene las bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención, como una sustancia que estimula las células de los parches de Peyer y midiendo la cantidad de IgA producida. Las condiciones utilizadas en este último método se consideran que son más próximas a las actuales en el medio *in vivo*. Más específicamente, cuando se administra por vía oral en esta prueba las bacterias ácido-lácticas (células viables o inviables) de la invención, cabe esperar que las bacterias ácido-lácticas ingeridas proporcionen algunos estímulos a las células de los parches de Peyer.

Se prepararon bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención como sustancia que estimula las células de los parches de Peyer según el procedimiento siguiente.

Bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención para la estimulación de los parches de Peyer

La suspensión de bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención para administración bucal preparada anteriormente se diluyó más con un tampón de ácido fosfórico hasta conseguir una concentración de 10^7 UFC/ml (turbidez: 0,275 a 660 nm) y la suspensión de células bacterianas resultante se introdujo en el autoclave (calentado a 121°C durante 15 minutos) y a continuación se sometió a ultrasonidos utilizando un baño de ultrasonidos de lavado (BRANSON 2510) durante 45 minutos.

En el método que utiliza la sustancia que estimula las células de los parches de Peyer, se añadieron a cada pocillo 10 µl de bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención para la estimulación de las células de los parches de Peyer y a continuación se añadió 100 µl a cada pocillo RPMI1640 sin FCS para cultivar las células de los parches de Peyer a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 7 días. En el método que no utiliza la sustancia que estimula las células de los parches de Peyer, se añadieron a cada pocillo 10 µl de solución salina fisiológica en lugar de las bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención y se siguió el mismo procedimiento que anteriormente para cultivar las células de los parches de Peyer.

(4) Medición

Los sobrenadantes del cultivo se aislaron de las soluciones del cultivo celular por centrifugación y se congelaron por almacenamiento a -80°C hasta que se utilizaron para medir las concentraciones totales de IgA producida en los sobrenadantes del cultivo.

Las concentraciones totales de IgA de los sobrenadantes del cultivo y las concentraciones totales de IgG de los sueros se determinaron por ELISA utilizando kits comercializados.

45 (5) Resultados

Las figura 1 y 2 muestran los resultados (concentración de IgA y concentración de IgG), respectivamente.

La figura 1 es un diagrama de barras que presenta las concentraciones de IgA de los sobrenadantes del cultivo (µg/ml). En la figura 1 las barras blancas muestran los resultados del grupo de administración de la solución salina fisiológica de referencia (indicado como "solución salina fisiológica"). Las barras con trama muestran los resultados del grupo de administración de bacterias ácido-lácticas (células viables) de la invención (células b0240 viables) (indicado como "células b0240 viables"). Las barras negras muestran los resultados del grupo de administración de bacterias ácido-lácticas (células b0240 inviables) de la invención (indicado como "células b0240 inviables"). "Sin estímulo" hace referencia a los casos en los que las células de los parches de Peyer de cada grupo se cultivaron en un sistema de cultivo que no contiene bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención. "Estimulación celular" hace referencia

5 a los casos en los que las células de los parches de Peyer procedentes de los ratones de cada grupo se cultivaron bajo la estimulación de las bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención añadiendo las bacterias ácido-lácticas de la invención a un sistema de cultivo. Los resultados obtenidos utilizando 5 ratones en cada grupo se presentan como media \pm desviación estándar (media \pm SD). Los valores p presentados anteriormente los resultados representan niveles de significación relativos al control en un Ensayo de la t de Student.

Los resultados presentados en la figura 1 indican claramente lo siguiente:

(1) Administración en 7 días:

10 En el caso de la estimulación celular, el grupo de administración bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables) presentaban un valor significativamente mayor comparado con el grupo de administración de solución salina fisiológica de referencia ($p = 0,010$).

(2) Administración en 14 días:

En el caso de falta de estimulación, el grupo de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables) presentaba un valor significativamente superior ($p = 0,048$) (barra negra de falta de estimulación) que el de referencia (falta de estimulación tras la administración de solución salina fisiológica).

15 En el caso de estimulación celular, ambos grupos de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables y viables) presentaban valores significativamente superiores ($p = 0,034$ y $p = 0,002$, respectivamente) que la referencia (administración de solución salina fisiológica).

(3) Administración en 21 días:

20 En el caso de falta de estimulación, el grupo de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables) presentaba un valor significativamente superior ($p = 0,047$) que el grupo de referencia.

En el caso de estimulación celular, ambos grupos de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables y viables) presentaban valores significativamente superiores ($p = 0,015$ y $p = 0,005$, respectivamente) que el grupo de referencia.

25 La figura 2 es un gráfico de barras que presenta la influencia de la administración de 21 días de bacterias ácido-lácticas (células inviables) de la invención sobre la producción de IgG. La concentración de IgG en el suero ($\mu\text{g/ml}$) se representa en ordenadas.

30 Los resultados mostrados en la figura 2 indican claramente que el grupo de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células inviables) presentaba una concentración de IgG en el suero significativamente superior ($p = 0,0064$) que el de referencia (administración de solución salina fisiológica); y el grupo de administración de bacterias ácido-lácticas de la invención (células viables) presentaba también una concentración de IgG en el suero significativamente mayor que el de referencia (administración de solución salina fisiológica).

35 Los resultados anteriores se consideran que deben producirse de la forma siguiente: las bacterias ácido-lácticas de la invención provocan respuestas inmunitarias de las mucosas estimulando células inmunocompetentes en los parches de Peyer o en las células epiteliales de los intestinos y en las células inmunocompetentes circundantes que por último aumentan la producción total de IgA de los parches de Peyer. Los resultados muestran además claramente que la administración de las bacterias ácido-lácticas de la invención puede aumentar no solamente IgA sino también IgG en el suero. Estos sugieren que el consumo de bacterias ácido-lácticas de la invención estimula no solamente la inmunidad de las mucosas sino también la inmunidad general de modo que las respuestas inmunitarias *in vivo* están doblemente estimuladas, permitiendo de este modo a un organismo hospedador defenderse desde el interior y exterior.

40 Ya que no solamente las células viables sino también las células inviables presentan dicha actividad, cabe esperar que las bacterias ácido-lácticas de la invención sean útiles en nuevos procedimientos probióticos tales como las vacunas bucales.

EJEMPLO 4

45 Este ejemplo se proporciona para demostrar la eficacia de las bacterias ácido-lácticas de la invención para prevenir la infección de la gripe en el aparato respiratorio inferior.

50 La inmunidad de las mucosas es la primera fase del mecanismo de defensa de la infección cuando un patógeno ataca a la mucosa (Brandtzaeg, P., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 146:13, 1989). IgA secretora de las mucosas (S-IgA) tiene propiedades defensivas contra los patógenos tales como bacterias y virus (Czinn, S. J. *et al.*, *Vaccine* 11:637, 1993; Renegar, K. *et al.*, *J. Immunol.*, 146:1972, 1991), y además desempeña una función en la neutralización de las toxinas producidas por microorganismos (Brandtzaeg, P., *APMIS* 103:1, 1965; Kilian, M. *et al.*, *Microb. Rev.*, 52:296, 1988). En los últimos años, se ha realizado mucha investigación y desarrollo sobre fármacos para enfermedades infecciosas destinados a efectos protectores contra la infección a través del sistema inmunitario de las mucosas. La tasa de mortalidad procedente de la infección por gripe es alta en niños con un sistema inmunitario

infradesarrollado y la gente mayor cuyas funciones inmunitarias se han reducido, y es deseable el desarrollo de una vacuna más eficaz en lugar de las vacunas actuales. Más específicamente, como el tipo de virus de la gripe predominante cambia cada año, el desarrollo de una vacuna para la mucosa basada en una IgA moderadamente específica producida por inmunidad de las mucosas en puntos infectados por el virus en lugar de una IgG muy específica producida por la administración transdérmica se ha intentado de varias maneras. Los alimentos que utilizan bacterias ácido-lácticas, tal como la leche fermentada, se ha publicado también que tienen efectos protectores contra la infección basados en la IgA. Por ejemplo, Yasui *et al.*, realizaron un experimento con un ratón infectado por rotavirus, un virus que es la causa principal de la diarrea infantil, en el que se administró YIT4064 de *B. breve* a ratones madre y la leche de las madres se administró a ratones lactantes y se publicó el resultado de que se había inhibido la diarrea en los ratones lactantes (H. Yasui *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 172:403, 1995). Yasui *et al.* han publicado también que la administración de YIT4064 de *B. breve* aumenta la IgG específica para el virus de la gripe en el suero y protege así a los ratones contra la infección por la gripe, ya que el grado de protección contra la infección contra el virus de la gripe se correlaciona con los niveles de inmunidad humoral e inmunidad celular tal como la inmunoglobulina A de las mucosas (IgA) en el aparato respiratorio e IgG en el suero (H. Yasui *et al.*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6:186, 1999).

Para investigar los efectos protectores de la infección por IgA de bacterias ácido-lácticas, se utilizaron ratones modelo infectados en el aparato respiratorio inferior en el que los virus de la gripe (IFV) alcanzaron el aparato respiratorio inferior, y se evaluaron los efectos protectores contra la infección del consumo de la composición de la composición de la invención (leche fermentada preparada utilizando las bacterias ácido-lácticas de la invención) utilizando como índice el número de días de supervivencia después de la infección. El ensayo se realizó de la manera siguiente.

(1) Animales experimentales

Se aislaron ratones hembra endogámicos SPF/VA/VAF de 5 semanas de vida (cepa: BALB/c AnNCrj) adquiridos en Charles River Japan Inc. en las condiciones presentadas a continuación durante 4 días y se dividieron en 3 grupos (un grupo con agua destilada, un grupo con leche y un grupo con leche fermentada que contenía las bacterias ácido-lácticas de la invención) de tal manera que el peso corporal medio de cada grupo era esencialmente el mismo.

Suministro de alimentos: Dieta MF sólida (producto de Oriental Yeast Co., Ltd.)/alimentación libre.

Suministro de agua: agua de grifo/alimentación a discreción de la botella; temperatura ambiente, $23 \pm 2^\circ\text{C}$; humedad, $60 \pm 10\%$.

Horas de luz: periodo con luz, 7:00 a 19:00;

Periodo de oscuridad, 19:00 a 7:00

(2) Método de ensayo

Se administraron sustancias de ensayo ((1) agua destilada, (2) leche de vaca o (3) leche fermentada que contenía las bacterias ácido-lácticas de la invención) con la dieta sólida de MF (producto de Oriental Yeast Co., Ltd.) a los ratones de cada grupo ($n = 45$) durante 2 semanas.

Se preparó leche de vaca del ensayo diluyendo leche LL (leche de vaca Oaso; producto de Rakunou Mothers (Kumamoto Dairy Cooperative Association) al 75% con agua destilada. Se preparó leche fermentada del ensayo que contenía las bacterias ácido-lácticas de la invención utilizando *L. plantarum* ONRIC b0240 en suspensión en solución acuosa al 10% de leche desnatada y congelada por almacenamiento a -80°C como iniciador. El iniciador (recuento de células viables: 10^8 células) se añadió a 1 litro de leche de vaca y se fermentó a 33°C durante 16 horas para conseguir un contenido de células de 5×10^7 células/ml, que se diluyó al 75% con agua destilada.

Las sustancias de ensayo se alimentaron a discreción mediante una botella de suministro de agua. La ingesta de alimento se calculó a partir de la reducción del peso de las sustancias de ensayo comparando los pesos iniciales de las sustancias de ensayo con los de después de la alimentación.

Dos semanas después del comienzo de la ingesta, los ratones en cada grupo se anestesiaron con "Ketalar" (hidrocloruro de cetamina) y se infectaron con IFV administrando 50 μl de una solución de IFV en una concentración de 10 , 10^2 o 10^3 ufp/ 50 μl de PBS/ratón (15 ratones cada uno) por una cavidad nasal para inoculación nasal. Se comprobó cada día la supervivencia o muerte de los ratones en cada grupo. Desde el momento de la infección hasta la confirmación de la muerte los ratones tenían libre acceso a las sustancias del ensayo.

La cepa IFV: A/PR/8/34/H1N1 almacenada en el Instituto de Investigación de Microorganismos de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. se utilizó como cepa IFV. La cepa se puso en suspensión en MEM que contenía 0,1% de BSA y HEPES 10 mM y se diluyó con PBS(+) hasta conseguir una concentración de 10 a 10^3 ufp/50 μl , proporcionando así una solución vírica para la inoculación de IFV. Se preparó PBS(+) disolviendo 9,55 g de PBS (-) en polvo (producto de Kojin-Bio Co.), 100,00 mg de CaCl_2 anhidro y 46,90 mg de MgCl_2 anhidro en agua destilada para preparar un volumen de 1.000 ml.

Resultados

Se comprobó el número de días de supervivencia después de la inoculación nasal de IFV de los ratones en cada grupo por observación cada mañana (8:30-9:00) y tarde (17:30-18:00), es decir, dos veces al día.

5 Cuando se inoculaba el virus a una concentración de 10^2 ufp/ratón, todos los ratones en el grupo de referencia (grupo de administración de agua destilada) y el grupo comparativo (grupo de administración de leche) murieron el día 7. Cuando se inoculó el virus a una concentración de 10^3 ufp/ratón, todos los ratones en los dos grupos murieron en la tarde del día 6. En cambio, el grupo de administración de leche fermentada que contenía las bacterias ácido-lácticas de la invención presentaba una tendencia a prolongar el periodo de supervivencia de los ratones sobre el del grupo de referencia.

10 Cuando se inoculaba el virus a una concentración de 10 ufp/ratón, el 70% o más de los ratones sobrevivieron todavía en todos los grupos el día 14; sobreviviendo el 86,7% de los ratones en el grupo de administración con leche fermentada que contenía las bacterias ácido-lácticas de la invención, demostrando de este modo una tendencia a prolongar la tasa de supervivencia en comparación con la del (80%) del grupo de referencia.

15 Se midió el peso de los ratones en cada grupo utilizando una escala electrónica cada dos días desde el comienzo de la ingesta de las sustancias de ensayo hasta el día de la infección, y a continuación se midió cada mañana después (8:30-9:00). La medición se realizó en los ratones supervivientes en cada día de medición y la media de todas las mediciones en los ratones en el mismo grupo se presenta como valor obtenido.

En todos los grupos se observó una reducción de peso ligera desde el día 2. La tendencia al cambio de peso era similar entre todos los grupos y no se observaron diferencias sustanciales.

20 Consideración

A partir de los resultados de este ensayo y de los resultados del ensayo presentados en los ejemplos 2 y 3, se concluye que las bacterias ácido-lácticas de la invención y la leche fermentada que las contiene, las bacterias ácido-lácticas tienen efectos protectores contra la infección por IFV.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

25 La presente invención proporciona bacterias ácido-lácticas que pueden estimular la inmunidad de las mucosas y favorecer la producción de IgA, y composiciones que contienen las bacterias. Las bacterias ácido-lácticas y las composiciones pueden inhibir la invasión de organismos patógenos a través de la mucosa, proporcionando así unos efectos protectores al hospedador.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una cepa de bacterias ácido-lácticas seleccionadas de entre el grupo constituido por *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM-BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM-BP-10065), y un vehículo comestible, pudiendo la composición estimular la inmunidad de las mucosas y estar en forma de un alimento o una bebida.
2. Composición según la reivindicación 1 que es una leche fermentada, una bebida con bacterias ácido-lácticas, una bebida de vegetal fermentado, una bebida de fruta fermentada o una bebida de leche de soja fermentada.
3. Utilización de la composición según la reivindicación 1 ó 2 para la preparación de una composición de alimento o de bebida para estimular la inmunidad de las mucosas en una persona que necesita dicha estimulación.
- 10 4. Utilización de la composición según la reivindicación 1 ó 2 para la preparación de una composición de alimento o de bebida para favorecer la producción de IgA en una persona que necesita dicho tratamiento que favorece la producción de IgA.
5. Composición según la reivindicación 1 que está en forma de gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos efervescentes o cremas.
- 15 6. Composición farmacéutica para la inmunoestimulación de las mucosas humanas que comprende una cepa de bacterias ácido-lácticas seleccionadas de entre el grupo constituido por *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM-BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM-BP-10065) y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. Composición farmacéutica para favorecer la producción de IgA humana que comprende una cepa de bacterias ácido-lácticas seleccionadas de entre el grupo constituido por *Lactobacillus* ONRIC b0239 (FERM-BP-10064) y *Lactobacillus* ONRIC b0240 (FERM-BP-10065) y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
8. Utilización de la composición según la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento destinado a estimular la inmunidad de las mucosas en una persona que necesita dicha estimulación.
9. Utilización de la composición según la reivindicación 7 para la preparación de un medicamento destinado a favorecer la producción de IgA en una persona que necesita dicho tratamiento que favorece la producción de IgA.

Fig. 1

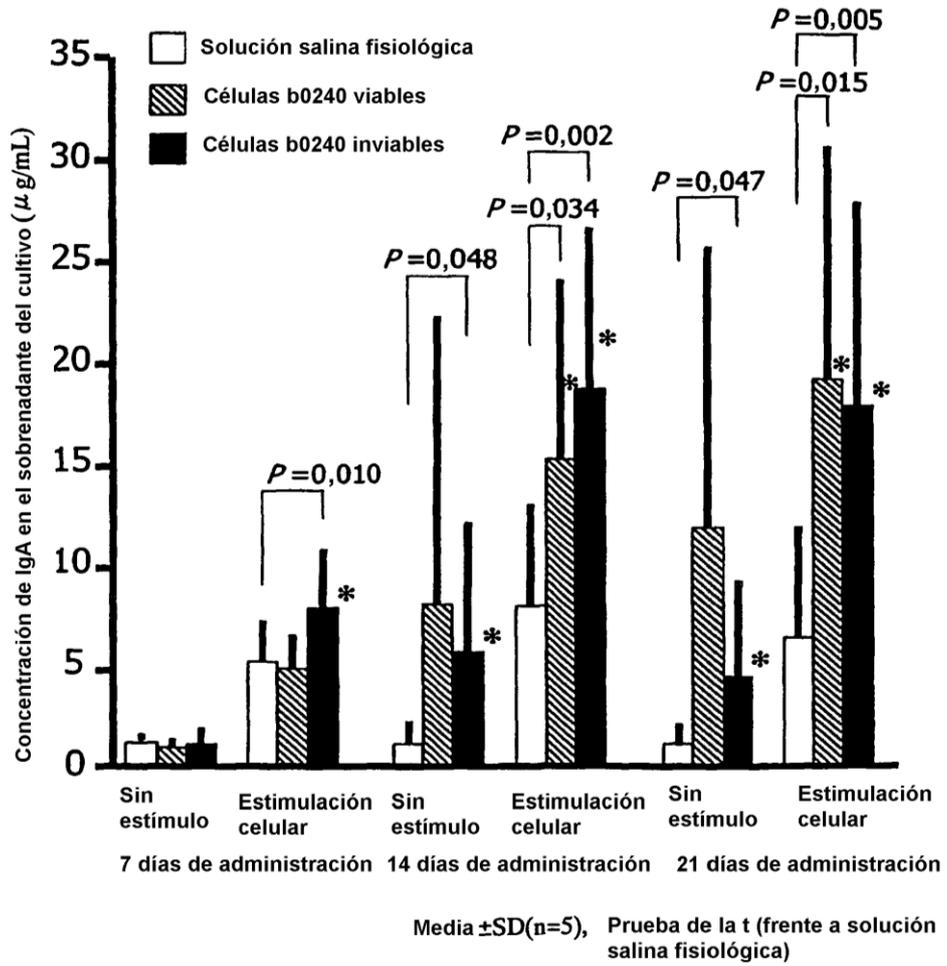
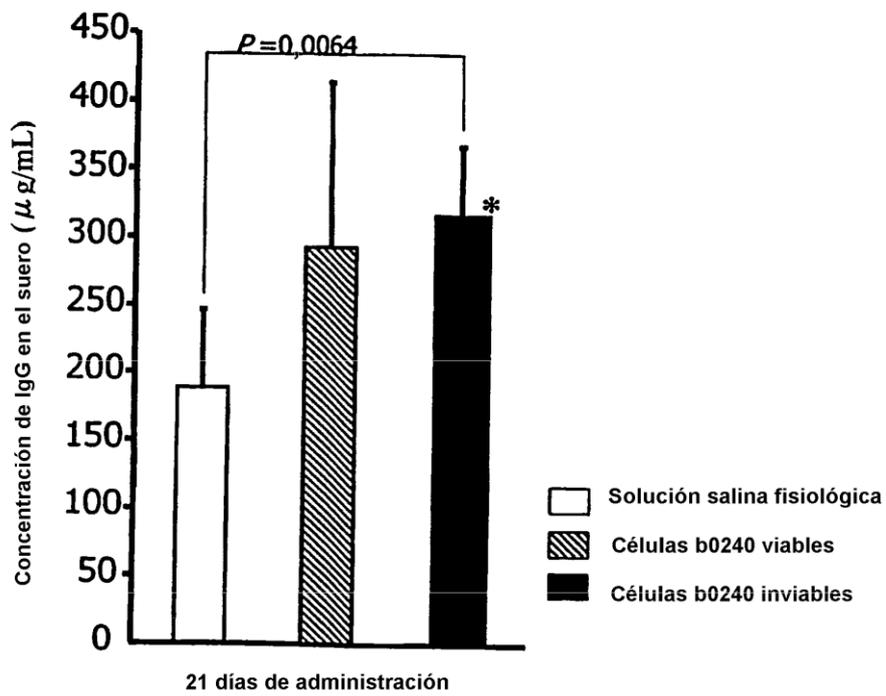


Fig. 2



Media \pm SD(n=5), Prueba de la t (frente a solución salina fisiológica)