

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 895**

51 Int. Cl.:

A23L 1/00 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07738057 .4**

96 Fecha de presentación: **08.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2002842**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2008**

54 Título: **Procedimiento de producción del regulador de producción de interleuquina**

30 Prioridad:
31.03.2006 JP 2006099905

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2012

73 Titular/es:
MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.
33-1, SHIBA 5-CHOME
MINATO-KU, TOKYO 108-8384, JP

72 Inventor/es:
IWABUCHI, Noriyuki;
SHIMIZU, Kanetada y
TAKAHASHI, Noritoshi

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 895 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).

DESCRIPCION

Procedimiento de producción del regulador de producción de interleuquina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un regulador de la producción de interleuquina que tiene el efecto de mantenimiento o de promoción de la producción de interleuquina-10 y el efecto de mantenimiento o de inhibición de la producción de interleuquina-12, el cual puede usarse en una composición farmacéutica y alimento o bebida.

Técnica antecedente

10 El síntoma principal de enfermedad autoinmune tal como enfermedad reumática o enfermedad del intestino inflamatorio es la inflamación. Se estima que existen citocinas que causan la inflamación y la incidencia de la inflamación depende del equilibrio entre citocinas que envían señales y receptores de citocinas que reciben las señales. Además, se estima que la inflamación se cura espontáneamente cuando las citocinas anti-inflamatorias son más fuertes, pero cuando la acción de citocinas pro-inflamatorias es fuerte, la inflamación continúa durante un largo período de tiempo y llega a transformarse en inflamación crónica. Tal como se ha descrito anteriormente, puesto que se
15 estima que el equilibrio de producción de citocinas (por ejemplo, interleuquinas) contribuye de manera significativa al desarrollo de la enfermedad autoinmune, puede considerarse que la regulación de la producción de estas citocinas es importante para prevenir o tratar dicha enfermedad.

La IL-10 es una citocina producida por células T, células B, macrófagos, y células dendríticas. La IL-10 promueve la proliferación y diferenciación de células B dentro de células que secretan anticuerpos, y muestran principalmente actividades anti-inflamatorias. Se estima que esto está basado en un mecanismo en el cual la IL-10 sobre-regula la expresión de la IL-1RA mediante monocitos e inhibe la mayoría de las actividades inflamatorias de los monocitos. En tiempos pasados, ha resultado ya evidente que la IL-10 inhibe la producción de colagenasa intestinal y de colagenasa tipo IV al interferir con una vía dependiente de PGE2-cAMP y, en consecuencia, se estima que la IL-10 puede usarse como un regulador de la destrucción del tejido conjuntivo observada en la enfermedad inflamatoria crónica. El Documento de Patente 3 divulga cepas de *Lactococcus* (especialmente *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* C60) como microorganismos que inducen eficazmente la producción de IL-10.
20

La IL-12 es una citocina producida fundamentalmente por células que presentan antígenos tales como macrófagos anticipadamente en la cascada inflamatoria, y es una proteína heterodimétrica de 70 KD compuesta de proteínas de 35 kD y de 40 kD. La IL-12 es un inductor fuerte de la producción de IFN- γ e igualmente es un activador de células asesinas naturales. Se estima que la IL-12 es una citocina importante para la generación de respuestas inmunes mediadas por células, o TH1, fundamentalmente a través de su capacidad para activar células para la producción de IFN- γ . Es decir, la IL-12 muestra de manera general actividades pro-inflamatorias.
25

Es sabido que las bifidobacterias muestran diversos efectos fisiológicos basados en su funcionalidad, tales como de regulación de las funciones intestinales y de reducción de colesterol en suero, cuando se ingieren dentro del cuerpo en la forma de, por ejemplo, leche fermentada. En los últimos años, se ha introducido el concepto de "probióticos (microorganismos vivos que afectan de manera beneficiosa al mantenimiento de la salud del huésped)" y, en consecuencia, dichos efectos fisiológicos de las bifidobacterias han recibido una amplia atención en la consideración del consumidor consciente de su salud, por lo que están siendo llevados a cabo diversos estudios. La palabra "probióticos" se definió originalmente como "suplementos alimenticios microbianos vivos que afectan de manera beneficiosa al animal huésped mediante la mejora del equilibrio de su flora microbiana intestinal", pero actualmente se usa en el sentido amplio anteriormente descrito.
30

Entre los diversos efectos fisiológicos de las bifidobacterias, han empezado a recibir atención los efectos sobre enfermedades autoinmunes tales como diabetes dependiente de la insulina y artritis reumatoide crónica, síndrome del intestino irritable, y enfermedad del intestino inflamatorio tal como colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn. A este respecto, por ejemplo, se sabe ya de un agente terapéutico para la colitis ulcerativa que contiene las células de un *Bifidobacterium* como un ingrediente activo (véase Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Consulta Pública No. 7-126177) y cepas de *Bifidobacterium* eficaces para la prevención y/o el tratamiento de la actividad inflamatoria gastrointestinal, tal como enfermedad del intestino inflamatorio o síndrome del intestino irritable (véase Publicación Nacional de Solicitud de Patente Japonesa No. 2005-508617).
35

Además, se ha informado previamente ya que las células de bifidobacterias estimulan células que presentan antígenos profesionales tales como macrófagos y células dendríticas para inducir la producción de IL-12 (es decir, una capacidad de inducción de producción de IL-12) (véase International Archives of Allergy and Immunology (Int Arch Allergy Immunol), vol. 135, págs. 205-215, (2004)). Además, se ha informado previamente ya que las bifidobacterias inducen la producción de IL-10 (es decir, una capacidad de inducción de producción de IL-10) (véase Publicación Nacional de Solicitud de Patente Japonesa No. 2005-508617). Se estima que la capacidad de las bifidobacterias para inducir la producción de diversas interleuquinas (ILs) varía dependiendo del tipo de cepa, y diversos estudios se han realizado hasta ahora basados en dicha forma de pensar.
40

Entre la técnica anterior adicional, la Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Consulta Pública No. 2005-154387 divulga que los cocos del género *Lactococcus* son co-cultivados conjuntamente con las células dendríticas o las células del bazo de un mamífero para seleccionar una cepa que tenga altas propiedades de inducción de la producción de IL-10. Un procedimiento de selección para los microorganismos o los componentes comprende el cultivo de microorganismos, por ejemplo los cocos que pertenecen al género *Lactococcus* conjuntamente con células del epitelio intestinal para seleccionar la cepa mediante la actividad Caspase-1 y la capacidad de inducción de producción de IL-18, proporcionándose un alimento o un material alimenticio y alimento animal que contiene los cocos que pertenecen al género *Lactococcus* como un ingrediente activo.

Entre la técnica anterior adicional, Amrouche y otros, en *International Dairy Journal*, vol. 16, págs. 70-80, (2006), divulgan que extractos bifidobacterianos, fundamentalmente las paredes de las células, estimulan la proliferación de linfocitos y sugieren que dichos extractos podrían usarse en el control de ciertas inmunopatologías.

Entre la técnica anterior adicional, la Patente Japonesa JP 2004-262773 divulga una preparación farmacéutica que comprende un ingrediente de célula bacteriana de un bacterio del género *Bifidobacterium*, el cual mejora la resistencia al estrés y/o la disfunción de la competencia inmunológica inducida por el estrés. La preparación farmacéutica bacteriana de bifidus es útil para mejorar la disfunción del sistema inmunológico del canal intestinal causado como un resultado del estrés.

Entre la técnica anterior adicional, la Patente Japonesa JP 2000-095698 divulga un remedio que contiene un componente de célula microbiana de las bacterias del ácido láctico como un ingrediente activo. De acuerdo con esta referencia, las bacterias del ácido láctico pueden ser las bacterias que pertenecen al género de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* o similares. Un procedimiento de extracción del componente de la célula microbiana es preferiblemente el de someter las células microbianas al tratamiento de lisado mediante el uso de una enzima lítica, y posteriormente someter las células microbianas tratadas a tratamiento térmico. La pared de célula puede destruirse usando un procedimiento físico tal como un tratamiento ultrasónico o una prensa Francesa.

Entre la técnica anterior adicional, la Patente Japonesa JP H07-330806 divulga un polisacárido que se ha aislado a partir de la pared de la célula de *Bifidobacterium*, y la cual muestra propiedades físicas y químicas específicas, e induce el incremento de granulocitos en los glóbulos blancos.

Entre la técnica anterior adicional, la Patente Japonesa JP H06-056678 divulga un inmunopotenciador que contiene la fracción de pared de célula y/o la fracción citoplásmica de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* como ingredientes activos. Preferiblemente, el microorganismo es *Bifidobacterium adreicentis*. La fracción se obtiene mediante la centrifugación de las células del *Bifidobacterium adreicentis* cultivado anaeróticamente a 600 G a 5°C durante 10 minutos, la suspensión de las células nuevamente en agua destilada, la centrifugación bajo las mismas condiciones, el lavado de las mismas, la repetición de las operaciones 3 veces, la rotura de los cuerpos de las células con ondas ultrasónicas durante 15 minutos, la eliminación de las células sin romper mediante centrifugación a 800 a 1.000 G a 5°C durante 10 minutos y la realización de ultracentrifugación con 70.000 G a 5°C durante 10 minutos para precipitar la fracción de pared de la célula y recoger la fracción citoplásmica como un sobrenadante.

Entre la técnica anterior adicional, la Patente Japonesa JP H05-252900 describe un procedimiento para la producción de una composición inmunopotenciada, de acuerdo con el cual se cultiva al menos un tipo de bacterias del ácido láctico seleccionadas a partir de aquellas que pertenecen a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Leuconostoc*, y los microbios de bacterias lácticas en el producto cultivado y/o solución de cultivo resultante se trituran. A continuación, la fracción citoplásmica de los microbios y/o de un producto que contiene la fracción en el sobrenadante resultante son diluidos y concentrados, fraccionados, purificados y/o secados, obteniéndose, de esta forma, una composición inmunopotenciada útil para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades que resultan de diversos tipos de sustancias antigénicas o de microorganismos infecciosos.

Divulgación de la invención

Tal como se ha descrito anteriormente en la Técnica antecedente, es importante regular la producción de citocinas, especialmente de interleuquinas, para la prevención, tratamiento, y prevención de la recurrencia de la enfermedad intestinal y de enfermedades autoinmunes acompañadas por inflamación como un síntoma principal. Entre las diversas citocinas, pueden considerarse importantes la IL-10 como una citocina anti-inflamatoria y la IL-12 como una citocina pro-inflamatoria.

Por ello, es un objeto de la presente invención el proporcionar un procedimiento para la producción de un regulador de la producción de interleuquina que puede usarse para la prevención, tratamiento, y prevención de la recurrencia de la enfermedad intestinal y de la enfermedad autoinmune acompañadas por inflamación como un síntoma principal y que tiene tanto el efecto de mantenimiento o de promoción de la producción de interleuquina-10 como el efecto de mantenimiento o de inhibición de la producción de interleuquina-12.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, podría usarse un procedimiento para la producción de un regulador de la producción de interleuquina de acuerdo con la presente invención, para la prevención, tratamiento, y prevención de la recurrencia de la enfermedad intestinal y de la enfermedad autoinmune acompañada por inflamación

como un síntoma principal, y podría ser altamente segura y podría administrarse durante un largo período de tiempo sin temor.

Con el fin de lograr los objetos anteriores, los autores de la presente invención han investigado una materia prima que puede usarse para la prevención, tratamiento, y prevención de la recurrencia de la enfermedad intestinal y de la enfermedad autoinmune acompañada por inflamación como un síntoma principal, que es altamente segura cuando se usa como una preparación farmacéutica o alimento o bebida, y puede ser consumida durante un largo período de tiempo sin temor. Como un resultado de ello, los presente autores han encontrado que un producto de la rotura de la célula obtenido mediante la realización de la etapa de rotura de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* tiene una capacidad de regulación de la producción de interleuquina, poseyendo simultáneamente el efecto de mantenimiento o de promoción de la producción de interleuquina-10 y el efecto de mantenimiento o de inhibición de la producción de interleuquina-12, habiendo conducido este hallazgo al desarrollo de la presente invención.

De manera sorprendente, los autores de la presente invención han encontrado igualmente que los productos de la rotura de la célula de cualquiera de los microorganismos de ensayo (como materiales de partida) pertenecientes al género *Bifidobacterium* obtenidos mediante la realización de la etapa de rotura de dicho microorganismo, tienen dicha capacidad útil de regulación de la producción de interleuquina. Es decir, dicha capacidad útil de regulación de la producción de interleuquina puede obtenerse a partir de un producto de rotura de la célula de cualquier microorganismo que pertenezca al género *Bifidobacterium* obtenido mediante la suficiente rotura de las células de los mismos.

Dichos sorprendentes hallazgos refutan el conocimiento común entre los expertos en la técnica que es una premisa de los documentos de la técnica anterior tal como el Documento de No Patente 1, es decir, el conocimiento común de que la capacidad de los microorganismos que pertenecen al género *Bifidobacterium* para inducir la producción de diversas interleuquinas varía dependiendo del tipo de cepa, y en consecuencia, con el fin de usar una capacidad de inducción de producción de interleuquina deseada, es necesario dirigir la investigación y desarrollo hacia la búsqueda de una cepa deseada mediante el rastreo de diversas cepas, y el uso de (las células de una cepa que tienen) una capacidad de inducción de producción de interleuquina deseada, puede realizarse únicamente después de haber llevado a cabo dicho rastreo.

La presente invención está dirigida a un procedimiento para la producción de un regulador de la producción de interleuquina para el mantenimiento o la promoción de la producción de interleuquina-10 y el mantenimiento o la inhibición de la producción de interleuquina-12, comprendiendo el procedimiento la etapa de rotura de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* en suspensión llevado a cabo mediante rotura ultrasónica que se realiza con la energía de 7.800 Julios a 31.500 Julios por mililitro.

En el procedimiento de producción de acuerdo con la presente invención, el regulador de la producción de interleuquina puede lograr una relación de la cantidad de producción de interleuquina-10 producida de manera acelerada mediante su efecto de mantenimiento o de promoción de la producción de interleuquina-10 con respecto a la cantidad de producción de interleuquina-12 producida de manera reprimida mediante su efecto de mantenimiento o inhibición de la producción de interleuquina-12 (es decir, una relación de interleukina-10/interleuquina-12) de 10 o más, más preferiblemente de 20 o más.

Además, la etapa de rotura de un microorganismo se lleva a cabo mediante rotura ultrasónica.

Además, el microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* es, preferiblemente, uno o más microorganismos seleccionados entre el grupo que consiste en microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium longum*, microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium angulatum*, microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, y microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium catenulatum*.

La presente invención puede usarse para la producción de un regulador de la producción de interleuquina obtenido mediante el procedimiento de producción descrito anteriormente, el regulador de producción de interleuquina que tiene el efecto de mantenimiento o promoción de la producción de interleuquina-10 y el efecto de mantenimiento de inhibición de la producción de interleuquina-12.

El regulador de la producción de interleuquina de acuerdo con la presente invención puede lograr una relación de la cantidad de producción de interleuquina-10 producida de manera acelerada mediante su efecto de mantenimiento o de promoción de la producción de interleuquina-10 con respecto a la cantidad de producción de interleuquina-12 producida de manera reprimida mediante su efecto de mantenimiento o de inhibición de la producción de interleuquina-12 (es decir, una relación de interleukina-10/interleuquina-12) de 10 o más, más preferiblemente de 20 o más.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, podría ser posible producir un regulador de la producción de interleuquina que pueda usarse para la prevención, tratamiento, y prevención de la recurrencia de la enfermedad intestinal y de la enfermedad autoinmune acompañada por inflamación como un síntoma principal, el cual tenga tanto el efecto de mantenimiento o de promoción de la producción de interleuquina-10 como el efecto de mantenimiento o de inhibición de la producción de interleuquina-12. Además, podría ser posible también proporcionar dicho regulador de la producción de interleuquina, una composición farmacéutica que contenga el regulador de la producción de inter-

leuquina como un ingrediente activo, y un alimento o bebida que contenga el regulador de producción de interleuquina.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, el regulador de la producción de interleuquina podría ser útil para la prevención, tratamiento, y prevención de la recurrencia de la enfermedad intestinal y la enfermedad autoinmune acompañada por inflamación como un síntoma principal, es decir, la enfermedad autoinmune tal como diabetes dependiente de la insulina y la artritis reumatoide crónica, el síndrome del intestino irritable, y la enfermedad del intestino inflamatorio tal como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn.

El regulador de la producción de interleuquina producido de acuerdo con la presente invención usa, como un material de partida, las células de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium*, es decir, un denominado bifidobacterio. Las bifidobacterias han sido consumidas históricamente por los humanos en la forma de, por ejemplo, yogur durante un muy largo período de tiempo, y en consecuencia, su seguridad para humanos está asegurada a un muy alto nivel. Por esta razón, el regulador de la producción de interleuquina, composición farmacéutica y alimento o bebida son extremadamente seguros, y en consecuencia, pueden ser administrados o consumidos durante un largo período de tiempo sin temor.

15 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

En lo que sigue a continuación, se describirá en detalle una realización preferida de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada a la realización preferida siguiente, y pueden hacerse libremente cambios dentro del ámbito de la invención. Es de indicar que “por ciento” en la presente invención se refiere a “por ciento en masa” salvo que se especifique lo contrario.

No está particularmente limitada una cepa del microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* a usar en la presente invención, y puede ser una previamente depositada como una cepa que pertenece al género *Bifidobacterium* en una colección de cultivo público tal como la American Type Culture Collection (ATCC), Japan Collection of Microorganisms (JCM), Northeast Texas Community College (NTCC), o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) o puede ser una aislada a partir de la naturaleza (por ejemplo, heces humanas) mediante un procedimiento bien conocido tal como el descrito anteriormente. Los ejemplos de una cepa depositada en las colecciones de cultivo públicas incluyen FERM BP-7787, ATCC 27535, JCM 7041, y JCM 1194.

Como una fuente de suministro del microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium*, puede usarse un material que contenga dicho microorganismo. Los ejemplos de un material de este tipo incluyen suspensiones de células, cultivos de células (incluyendo células, sobrenadante de cultivos, y componentes del medio de cultivo), soluciones de cultivos de células obtenidas eliminando la materia sólida procedente de los cultivos de células, suspensiones de células criodesecadas, cultivos de células criodesecadas, y leche fermentada usando un alimento o bebida fermentada mediante bifidobacterias, tal como una bebida que contiene bifidobacterias, leche acidificada, y yogur. El microorganismo puede aislarse a partir de un material de este tipo, o puede usarse directamente un material de este tipo que contenga el microorganismo.

El microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* no siempre es necesario que sea una única cepa de *Bifidobacterium*, pudiendo usarse en combinación cepas plurales del microorganismo que pertenezcan al género *Bifidobacterium*. Además, el microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* puede usarse de manera apropiada en la forma de células viables, células húmedas, células secas, o células muertas.

Un ingrediente activo del regulador de la producción de interleuquina obtenido de acuerdo con la presente invención es un producto de la ruptura de la célula de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium*. La etapa de rotura de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* incluida en el procedimiento para la producción de un regulador de la producción de interleuquina de acuerdo con la presente invención, se lleva a cabo mediante rotura física. La rotura física es particularmente ventajosa dado que, por ejemplo, no es necesario agregar ninguna substancia adicional y, en consecuencia, no se deteriora la seguridad y garantía. Un ejemplo específico de un medio para la rotura de un microorganismo incluye la rotura física usando una prensa Francesa o un rompedor de células (por ejemplo, FastPerp FP120 fabricado por Funakosi Corporation). De acuerdo con la presente invención, se usa la rotura ultrasónica mediante, por ejemplo, un rompedor ultrasónico (por ejemplo, BRANSON SONIFIER® 450). En este caso, la rotura física puede llevarse a cabo mediante tratamiento por rotura ultrasónica a una potencia de aproximadamente 35 W (en un caso en el que la cantidad de una suspensión de muestra sea de aproximadamente 4 ml) durante 5 minutos o más (preferiblemente 10 minutos o más, más preferiblemente 15 minutos o más y generalmente 60 minutos o menos). La rotura física se lleva a cabo mediante tratamiento ultrasónico realizado proporcionando energía igual a la descrita anteriormente por unidad de volumen. La rotura física se lleva a cabo mediante la realización de dicho tratamiento de manera tal que se suministra una energía de 7.800 Julios o mayor y 31.500 Julios o menor por mililitro de una solución de muestra. Una frecuencia ultrasónica a usar en el tratamiento ultrasónico está generalmente dentro del intervalo de 10 a 50 kHz, preferiblemente dentro del intervalo de 15 a 40 kHz, preferiblemente de manera particular dentro del intervalo de 15 a 30 kHz. Los ejemplos de un dispositivo a usar para el tratamiento ultrasónico incluyen, además del BRANSON SONIFIER® descrito anteriormente, el TITEC VP-5S, VP-15S, y VP-30S y MISONIX ASTRASON® S3000 y XL2020, por ejemplo. Una potencia mayor del rompedor ultrasónico tiende a hacer posible el romper suficientemente un microorganismo en un menor tiempo. La etapa de

rotura de un microorganismo puede llevarse a cabo mediante un tratamiento ultrasónico tal como se ha descrito anteriormente.

El producto de rotura de la célula de un microorganismo que pertenece género *Bifidobacterium* contenido como un ingrediente activo en el regulador de la producción de interleuquina anteriormente mencionado, composición farmacéutica y alimento o bebida, es un producto natural y, en consecuencia, es altamente seguro cuando se consume, y está contenido en algunos productos alimenticios y leche consumidos, y no tiene toxicidad, y produce pocos efectos secundarios incluso cuando se consume de manera continuada durante un largo periodo de tiempo. En consecuencia, el producto de la rotura de las células de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium*, puede administrarse de manera apropiada mediante, por ejemplo, la vía oral, y puede conformarse en comprimidos, cápsulas, trociscos, jarabes, gránulos, polvos, y similares mediante procedimientos conocidos. Además, el producto de rotura de las células de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium*, puede agregarse como un ingrediente activo a un producto alimenticio, e igualmente puede transformarse dentro de un alimento funcional que tenga el efecto de prevención y/o de tratamiento de una enfermedad autoinmune o de enfermedad intestinal como un aspecto de la prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune o de enfermedad intestinal.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, la dosis del producto de rotura de las células de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* como un ingrediente activo del regulador de la producción de interleuquina, composición farmacéutica y alimento o bebida, variaría dependiendo de la forma de dosificación, síntoma, edad, peso corporal, etc., pero podría estar dentro del intervalo de 0,1 µg a 0,5 g/kg de peso corporal/día por vía oral, preferiblemente dentro del intervalo de 1 µg a 0,2 g/kg de peso corporal/día, preferiblemente de manera particular dentro del intervalo de 10 µg a 50 mg/kg de peso corporal/día, con el fin de obtener de manera eficaz su efecto de prevención y/o tratamiento de una enfermedad autoinmune o de enfermedad intestinal.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, una composición farmacéutica de este tipo podría producirse, por ejemplo, mediante la preparación del producto de rotura de las células de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* usando cualquier aditivo aceptable farmacéuticamente tales como excipientes. En el caso de la preparación de una formulación de este tipo, la cantidad del producto de la rotura de las células de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* contenido en la formulación está usualmente dentro del intervalo de 0,001 a 10% en masa, preferiblemente dentro del intervalo de 0,01 a 10% en masa. Los ejemplos de los aditivos a usar para la preparación de la formulación incluyen excipientes, aglomerantes, desintegrantes, lubricantes, estabilizadores, agentes aromatizantes, diluyentes, y disolventes inyectables.

Los ejemplos de los excipientes incluyen: derivados de azúcar tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y sorbitol; derivados del almidón tales como almidón de maíz, almidón de patata, α-almidón, dextrina, y carboximetil almidón; derivados de celulosa tales como celulosa cristalina, hidroxipropil celulosa, hidropropilmetil celulosa, carboximetil celulosa, y carboximetil celulosa cálcica; goma arábiga; dextrano; pululano; derivados de silicato tales como ácido silícico anhídrido de bajo peso, silicato de aluminio sintético, y aluminosilicato magnésico; derivados de fosfato tal como fosfato cálcico; derivados de carbonato tal como carbonato cálcico; y derivados de sulfato tal como sulfato cálcico. Los ejemplos de los aglomerantes incluyen, además de los excipientes anteriormente mencionados, gelatina; polivinil pirrolidona; y magrogol. Los ejemplos de los desintegrantes incluyen, además de los excipientes anteriormente mencionados, almidón químicamente modificado o derivados de celulosa tales como crosscarmelosa sódica, carboximetilalmidón sódico, y polivinil pirrolidona reticulada. Los ejemplos de los lubricantes incluyen talco; ácido esteárico; estearatos de metales tales como estearato cálcico y estearato magnésico; sílice coloidal; ceras tales como cera de abeja y cera espermaceti; ácido bórico; glicol; ácidos carboxílicos tales como ácido fumárico y ácido adípico; carboxilatos sódicos tal como benzoato sódico; sulfatos tal como sulfato sódico; leucina; lauril sulfatos tales como lauril sulfato sódico y lauril sulfato magnésico; silicatos tales como anhídrido del ácido silícico e hidrato del ácido silícico; y derivados de almidón. Los ejemplos de los estabilizadores incluyen ésteres del ácido p-hidroxibenzoico tales como metilparabeno y propolparabeno; alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico, y alcohol feniletílico; cloruro de benzalconio; anhídrido acético, y ácido ascórbico. Los ejemplos de los agentes aromatizantes incluyen edulcorantes, acidulantes, y aromas. Los ejemplos de los diluyentes inyectables incluyen agua, etanol, y glicerina.

Un ejemplo del indicador de una capacidad de regulación de la producción de interleuquina para un uso de este tipo, incluye uno obtenido mediante la evaluación simultánea del efecto de mantenimiento o de promoción de la producción de interleuquina-10 y el efecto de mantenimiento o de inhibición de la producción de interleuquina-12. Más específicamente, una capacidad de regulación de la producción de interleuquina puede expresarse como una relación cuantitativa de interleuquina-10 a interleuquina-12 (es decir, una relación de IL-10/IL-12). La relación cuantitativa de interleuquina-10 a interleuquina-12 (es decir, la relación de IL-10/IL-12) puede calcularse, por ejemplo, mediante un procedimiento descrito en PNAS, vol. 102, no. 29, págs. 10321 a 10326, (2005).

En un caso en el que la producción de interleuquina-10 se mantenga o promueva y la producción de interleuquina-12 se mantenga o inhiba, la relación cuantitativa de interleuquina-10/interleuquina-12 llega ser relativamente alta (sin embargo, no está incluido un caso en el que la producción de IL-10 y la producción de IL-12 se mantengan ambas simultáneamente). A este respecto, es posible que la cantidad de la producción de interleuquina-10 o de interleuquina-12 pueda medirse no solamente mediante un procedimiento inmunológico tal como ELISA, sino también mediante un procedimiento conocido de medición de la concentración de proteína.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra gráficas de la cantidad de producción de IL-12p70 inducida por células intactas o un producto de células rotas de cada cepa;

5 La Fig. 2 muestra gráficas de la cantidad de producción de IL-10 inducida por células intactas o un producto de células rotas de cada cepa; y

La Fig. 3 muestra gráficas de la cantidad de producción de IL-12p70 e IL-10 inducidas por productos de células tratados con oscilación ultrasónica para diferentes periodos de tiempo y una gráfica de la relación de IL-10/IL-12.

En lo que sigue a continuación, se describirá con mayor detalle la presente invención con referencia a los ejemplos siguientes, pero sin estar limitada a estos ejemplos.

10 Ejemplo de Referencia 1

Producción de comprimidos conteniendo producto de rotura de células de *Bifidobacterium longum* BP-7787

Se agregaron 150 g de polvo de producto de rotura de células de *Bifidobacterium longum* BP-7787, 100 g de polvo de lactosa (fabricado por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 635 g de polvo de maltodextrina (fabricado por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.), 85 g de leche en polvo descremada (fabricado por Morinaga Milk Industry, Co., Ltd.), 15 1 g de polvo edulcorante de stevia (fabricado por San-Ei Gen F.F.I., Inc.), 5 g de polvo aromatizado de yogur (fabricado por San-Ei Gen F.F.I., Inc.), y 24 g de una preparación en polvo de éster de ácido graso de glicerina (fabricado por Riken Vitamin Co., Ltd.) y se mezclaron uniformemente, y la mezcla en polvo así obtenida se prensó en forma de comprimidos de manera continua usando una máquina de compresión (fabricada por Hata Iron Works Co., Ltd.) a una velocidad de compresión de 12 comprimidos/min a una presión de 9,8 kPa, para producir 1800 comprimidos 20 (aproximadamente 900 g, 0,5 g por comprimido) conteniendo un producto de la rotura de células de *Bifidobacterium longum* BP-7787 como un agente de alivio de los síntomas y/o un agente terapéutico para la enfermedad del intestino inflamatorio y del síndrome del intestino irritable.

Ejemplo de Referencia 2

Se disolvieron 10,8 kg de un hidrolizado de proteína de suero de leche (fabricado por Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 36 kg de dextrina (fabricada por Showa Sangyo Co., Ltd.), y pequeñas cantidades de vitaminas solubles en agua y minerales, en 200 kg de agua, para preparar una fase acuosa en un tanque. Al mismo tiempo, se mezclaron 25 3 kg de aceite de cocción de soja (fabricado por Taiyo-yushi Co., Ltd.), 8,5 kg de aceite de palma (fabricado por Taiyo-yushi Co., Ltd.), 2,5 kg de aceite de azafrán (fabricado por Taiyo-yushi Co., Ltd.), 0,2 kg de lecitina (fabricada por Ajinomoto Co., Inc.), 0,2 kg de monoglicérido de ácido graso (fabricado por Kao Corporation), y una pequeña 30 cantidad de vitaminas solubles en aceite, y se disolvieron para preparar una fase aceite. La fase aceite se agregó a la fase acuosa contenida en el tanque y, a continuación, se mezclaron mediante agitación. A continuación, la mezcla se calentó a 70°C y, a continuación, se homogeneizó adicionalmente mediante un homogeneizador a una presión de 14,7 MPa. A continuación, la mezcla homogeneizada se esterilizó a 90°C durante 10 minutos, se concentró, y se criodesecó, para preparar aproximadamente 59 kg de producto intermedio en polvo. A 50 kg del producto intermedio 35 en polvo así obtenido, se agregaron 6,8 kg de sacarosa (fabricada por Hokuren), 167 g de polvo de mezcla de aminoácido (fabricado por Ajinomoto Co., Ltd.), y 60 g de un producto de rotura de células de *Bifidobacterium longum* BP-7787, y estos se mezclaron uniformemente para producir aproximadamente 56 kg de un polvo de nutrición entérico conteniendo un producto de rotura de células de *Bifidobacterium longum* BP-7787 y que tiene el efecto de prevenir y/o aliviar los síntomas de la diabetes dependiente de la insulina.

40 En lo que sigue a continuación, se describirá con mayor detalle la presente invención con referencia a los ejemplos siguientes.

Bifidobacteria usada en los ejemplos de ensayo de la presente invención

En la Tabla 1 se muestran las especies, depositario, número, nombre de identificación de cada cepa de *Bifidobacterium* usada en los ejemplos de la presente invención.

45 Tabla 1

Especies	Depositario	Número	Nombre de identificación
<i>Bifidobacterium longum</i>	FERM	BP-7787	BP-7787
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC	27535	ATCC27535
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	JCM	7041	JCM7041
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	JCM	1194	JCM1194

El procedimiento de ensayo de la presente invención

(Preparación de células intactas)

5 Cada una de las cepas de *Bifidobacterium* se cultivaron durante 16 horas usando medio MRS (de Man Rogasa Sharpe) (Difco) y, a continuación, un cultivo obtenido se lavó con PBS (solución salina tamponado con fosfato) dos veces, y se lavó adicionalmente con agua destilada dos veces y, a continuación, se suspendió en agua destilada y se criodesecó. La suspensión criodesecada se suspendió en PBS y, a continuación, se sometió a tratamiento térmico a 100°C durante 30 minutos para preparar las células intactas.

(Preparación de producto de células rotas)

10 Cada una de las cepas de *Bifidobacterium* mostradas en la Tabla 1 se cultivó durante 16 horas usando medio MRS (de Man Rogasa Sharpe) (Difco) y, a continuación, un cultivo obtenido se lavó con PBS (solución salina tamponado con fosfato) dos veces, y se lavó adicionalmente con agua destilada dos veces y, a continuación, se suspendió en agua destilada para obtener aproximadamente 4 ml de una muestra. La muestra se sometió a tratamiento ultrasónico sobre hielo usando un rompedor ultrasónico (BRANSON SONIFIER® 450) durante 60 minutos (control de potencia 4, potencia: equivalente a aproximadamente 35 W, frecuencia: 20 kHz, constante). La muestra se centrifugó a 800 x g durante 30 minutos para eliminar las células intactas. La muestra así obtenida se observó con un espéculo para confirmar que no existían células intactas en la misma y, a continuación, se criodesecó. La muestra criodesecada se suspendió en PBS y, a continuación, se sometió a tratamiento térmico a 100°C durante 30 minutos para preparar un producto de células rotas.

(Preparación de producto de células tratadas con oscilación ultrasónica)

20 El *B. pseudocatenulatum* JCM7041 se cultivó durante 16 horas usando medio MRS (de Man Rogasa Sharpe) (Difco) y el cultivo obtenido se lavó con PBS (solución salina tamponado con fosfato) dos veces y, a continuación, se suspendió en PBS para obtener suspensiones de cultivos con un volumen cada una de aproximadamente 4 ml. Las suspensiones de cultivos se sometieron a tratamiento ultrasónico sobre hielo usando un rompedor ultrasónico (BRANSON SONIFIER® 450) durante 0, 5, 15, 30, y 60 minutos, respectivamente (control de potencia 4, potencia: equivalente a aproximadamente 35 W, frecuencia: 20 kHz, constante) y, a continuación, se sometieron a tratamiento térmico a 100°C durante 30 minutos.

(Preparación de células de bazo)

30 Se prepararon ratones macho BALB/c de seis semanas de edad (disponibles de Charles River Laboratories) como animales experimentales y, a continuación, se diseccionaron a la edad de 7 a 9 semanas para extraer sus bazos. Las células de los bazos se obtuvieron a partir de los bazos diseccionados y, a continuación, se trataron con una solución de lisis de glóbulos rojos (cloruro amónico 0,144 M, trisaminometano 17 mM, pH 7,65) durante 3 minutos para preparar células de bazo de las cuales se habían eliminado los glóbulos rojos.

(Condiciones experimentales)

35 Las células de bazo preparadas mediante el procedimiento descrito anteriormente con referencia a "Preparación de células de bazo", se suspendieron en un medio obtenido agregando FCS (Gibco) al 10%, 100 IU/ml de penicilina, y 0,1 mg/ml de estreptomina a RPMI1640 (SIGMA) para obtener una suspensión de células conteniendo 2×10^6 células por mililitro. A continuación, se mezclaron 0,5 ml de la suspensión de células con el producto de células de manera tal que la concentración final del mismo alcanzó 1 µg/ml o 10 µg/ml y, la mezcla así obtenida, se cultivó en una microplaca de 48 pocillos (FALCON) a 37°C en la presencia de CO₂ al 5%. Después de un lapso de 2 días, se recogió un sobrenadante del cultivo para medir la citocinas contenidas en el sobrenadante del cultivo.

(Medición de citocinas)

La concentración de IL-10 se midió mediante ELISA usando Duo Set (R&D Systems). La concentración de IL-12p70 se midió concentrando el sobrenadante del cultivo a 1/10 mediante ultrafiltración (MultiScreen Ultracel-10, MILLIPORE) y, a continuación, realizando el ensayo ELISA usando Quantikine (R&D Systems).

45 Ejemplo de Ensayo 1: Comparación de la capacidad para inducir la producción de IL-12 e IL-10 entre el producto de las células rotas y las células intactas

En las Fig. 1 (IL-12p70) y Fig. 2 (IL-10), se muestran las cantidades de producción de citocinas inducidas en células de bazo de ratón mediante las células intactas o el producto de células rotas de cada una de las cepas.

50 La Fig. 1 muestra gráficas de la cantidad de producción de IL-12p70 inducida en células de bazo de ratón mediante la adición de las células intactas o el producto de rotura de las células en el Ejemplo de Ensayo 1 de la presente invención. En la Fig. 1, se muestran los promedios de tres experimentos y las desviaciones estándar. Además, el símbolo "***" en la Fig. 1 indica que existió una diferencia significativa a un nivel de significancia del 5% o menor cuando un caso en el que se agregaron las células intactas (indicado mediante una línea continua) se comparó me-

diante el ensayo t con un caso en el que se agregó el producto de células rotas (indicado mediante una línea de trazos).

5 Como un resultado de ello, en todos los casos de las cepas usadas en este ensayo, la cantidad de producción de IL-12p70 inducida mediante la adición del producto de las células rotas fue significativamente (ensayo t a un nivel de significancia del 5% o menor) inferior a algunas concentraciones de muestras en comparación con un caso en el que se agregaron células intactas. Esto indica que la capacidad del producto de las células rotas para inducir la producción de IL-12 es inferior que la de las células intactas.

10 La Fig. 2 muestra gráficas de la cantidad de producción de IL-10 inducida en células de bazo de ratón mediante la adición de las células intactas o el producto de rotura de las células en el Ejemplo de Ensayo 1 de la presente invención. En la Fig. 2, se muestran los promedios de tres experimentos y las desviaciones estándar. Además, el símbolo “*” en la Fig. 2 indica que existió una diferencia significativa a un nivel de significancia del 5% o menor cuando un caso en el que se agregaron las células intactas (indicado mediante una línea continua) se comparó mediante el ensayo t con un caso en el que no se agregaron (es decir, control) o cuando un caso en el que se agregó el producto de las células rotas (indicado mediante una línea de trazos) se comparó mediante el ensayo t con un caso en el que no se agregó el producto de células rotas (es decir, control).

15 Como un resultado de ello, en todos los casos de las cepas usadas en este ensayo, la cantidad de producción de IL-10 se incrementó de manera significativa (ensayo t a un nivel de significancia del 5% o menor) mediante la adición de las células intactas y el producto de las células rotas en comparación con un control que no contenía dicho producto de células. Esto indica que tanto las células intactas como el producto de las células rotas tienen la capacidad para inducir la producción de IL-10.

20 En la Tabla 2, se muestra la relación de la cantidad de producción de IL-10 con respecto a la cantidad de producción de IL-12p70 (es decir, la relación de IL-10/IL-12) medida después de la adición de las células intactas o del producto de las células rotas de cada cepa a una concentración de 10 µg/ml. A este respecto, es de señalar que en un caso en el que la concentración de IL-12p70 fue un límite de detección o inferior (es decir, 0,25 pg/ml, o inferior), la relación de la cantidad de producción se calculó usando el límite de detección. En todos los casos de las cepas, la relación IL-10/IL-12 se incrementó grandemente cuando se agregó el producto de las células rotas.

Tabla 2

Relación de IL-10/IL-12 de citocina inducida por células intactas y el producto de las células rotas

Especies	Cepa	Células intactas	Producto de células rotas
<i>Bifidobacterium longum</i>	BP-7787	14,8	107,9
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC27535	3,0	71,9
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	JCM7041	2,6	71,6
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	JCM1194	3,2	36,0

30 Tal como se ha descrito anteriormente, la capacidad de los productos de las células rotas de las bifidobacterias para inducir la producción de IL-12 fue inferior que la de las células intactas de las bifidobacterias, pero los productos de las células rotas y de células intactas de las bifidobacterias tenían ambos la capacidad para inducir la producción de IL-10. Este resultado indica que la capacidad de las bifidobacterias para inducir la producción de IL-12 puede reducirse mediante la rotura de sus células al tiempo que se mantiene su capacidad para inducir la producción de IL-10.

35 Además, la relación de IL-10/IL-12 se incrementó grandemente cuando se agregó el producto de las células rotas, comparada con cuando se agregaron las células intactas. Esto indicó que la relación de IL-10/IL-12 puede mejorarse de manera significativa mediante la rotura de las células de las bifidobacterias.

Ejemplo de Ensayo 2: Estudio sobre la duración del tiempo de rotura de las células

40 En la Fig. 3 se muestran las cantidades de producción de citocinas inducida en células de bazo de ratón mediante la adición de los productos de las células tratadas con oscilación ultrasónica durante diferentes períodos de tiempo (concentración de la muestra: 10 µg/ml, *B. pseudocatenulatum* JCM7041).

45 La Fig. 3 muestra gráficas de la cantidad de producción de IL-12p70 inducida en células de bazo de ratón mediante la adición de los productos de la rotura de *B. pseudocatenulatum* JCM7041 tratado con oscilación ultrasónica durante diferentes períodos de tiempo mostrados en ella y una gráfica de la relación de IL-10/IL-12 (“pg/ml”/“pg/ml”) en el Ejemplo de Ensayo 2 de la presente invención. En la Fig. 3, se muestran promedios de tres experimentos y las desviaciones estándar. En la gráfica de la cantidad de producción de IL-12p70, el símbolo “*” indica que existió una diferencia significativa a un nivel de significancia del 0,05 o menor cuando un caso en el que el producto de las células tratado con oscilación ultrasónica agregado se comparó mediante un ensayo t con un caso en el que se agrega-

ron las células intactas (es decir, el producto de las células tratadas con oscilación ultrasónica durante 0 minutos). En la gráfica de la producción de la cantidad de IL-10, el símbolo “**” indica que existió una diferencia significativa a un nivel de significancia del 5% o menor cuando un caso en el que el producto de las células agregado se comparó mediante un ensayo t con un control (límite de detección o inferior) que no contenía el producto de las células.

5 Como un resultado de ello, en todos los casos en el que se agregaron los productos de las células tratados con oscilación ultrasónica durante 5 minutos o más, la cantidad de producción de IL-12 se redujo de manera significativa (nivel de significancia: 5% o inferior), y un tiempo de rotura de células mayor dio como resultado una cantidad de producción más pequeña de IL-12. Más específicamente, cuando se agregó el producto de las células tratado con oscilación ultrasónica durante 15 minutos o más, la cantidad de producción de IL-12 se redujo de una manera extrema, y cuando se agregó el producto de las células tratado con oscilación ultrasónica durante 30 minutos o más, casi no se produjo IL-12. Por otra parte, la cantidad de producción de IL-10 fue significativamente más alta cuando no se agregaron ninguno de los productos de las células tratados con oscilación ultrasónica durante diferentes períodos de tiempo, en comparación con un control que no contenía el producto de las células. Más específicamente, la cantidad de producción de IL-10 se incremento ligeramente al incrementarse el tiempo de rotura de las células desde 0 hasta 5 minutos, pero después de este, tiene a reducirse ligeramente conforme se incrementó el tiempo de rotura de las células. Sin embargo, la totalidad de los productos de las células tratados con oscilación ultrasónica mantuvieron básicamente la capacidad para inducir la producción de IL-10 independientemente de la duración del tiempo de rotura de las células.

20 Los resultados anteriores indican que la capacidad de las bifidobacterias para inducir la producción de IL-12 puede reducirse mediante el tratamiento de las células de las bifidobacterias con oscilación ultrasónica usando el rompedor ultrasónico (BRANSON SONOFIER® 450) durante al menos 5 minutos o más. Además, tal como puede observarse a partir de la gráfica de la relación de IL-10/IL-12 en la Fig. 3, las células de las bifidobacterias son preferiblemente tratadas con oscilación ultrasónica durante al menos 5 minutos o más, más preferiblemente 15 minutos o más y generalmente 60 minutos o menos, para bloquear casi completamente su capacidad para inducir la producción de IL-12 y lograr una alta relación de IL-10/IL-12.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de producción de un regulador de la producción de interleuquina para el mantenimiento o la promoción de la producción de interleuquina-10 y el mantenimiento o la inhibición de la producción de interleuquina-12, comprendiendo el procedimiento la etapa de rotura de un microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* en suspensión realizada mediante rotura ultrasónica, la cual se lleva a cabo con la energía de 7.800 julios a 31.500 julios por mililitro.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la producción del regulador de la producción de interleuquina es un regulador de la producción de interleuquina para incrementar la relación de la producción de IL-10/producción de IL-12.
- 10 3. El procedimiento de producción de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el microorganismo que pertenece al género *Bifidobacterium* es uno o más microorganismos seleccionados entre el grupo que consiste en microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium longum*, microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium angulatum*, microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium pesuodocatenulatum*, y microorganismos que pertenecen a la especie *Bifidobacterium catenulatum*.

15

Fig.1

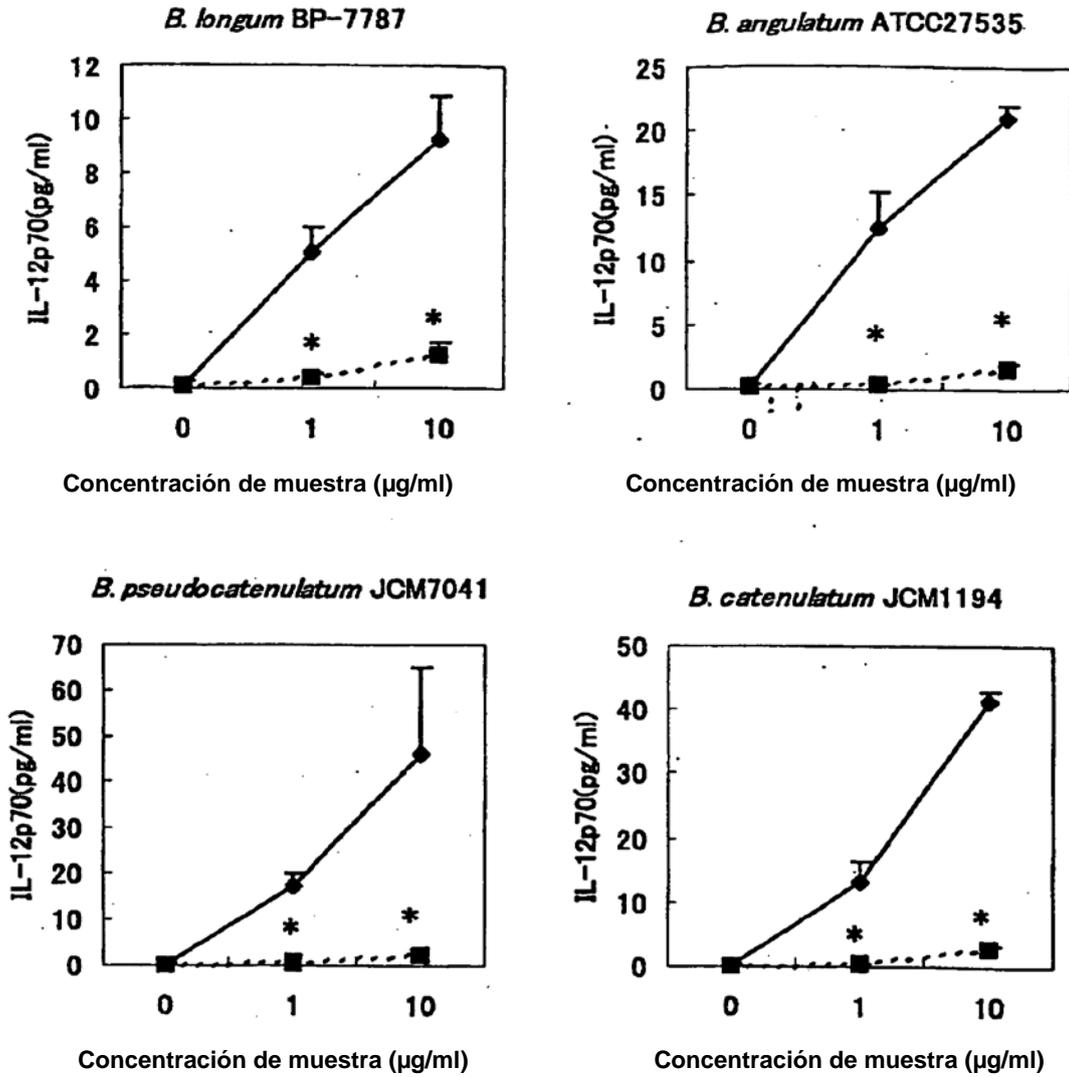


Fig.2

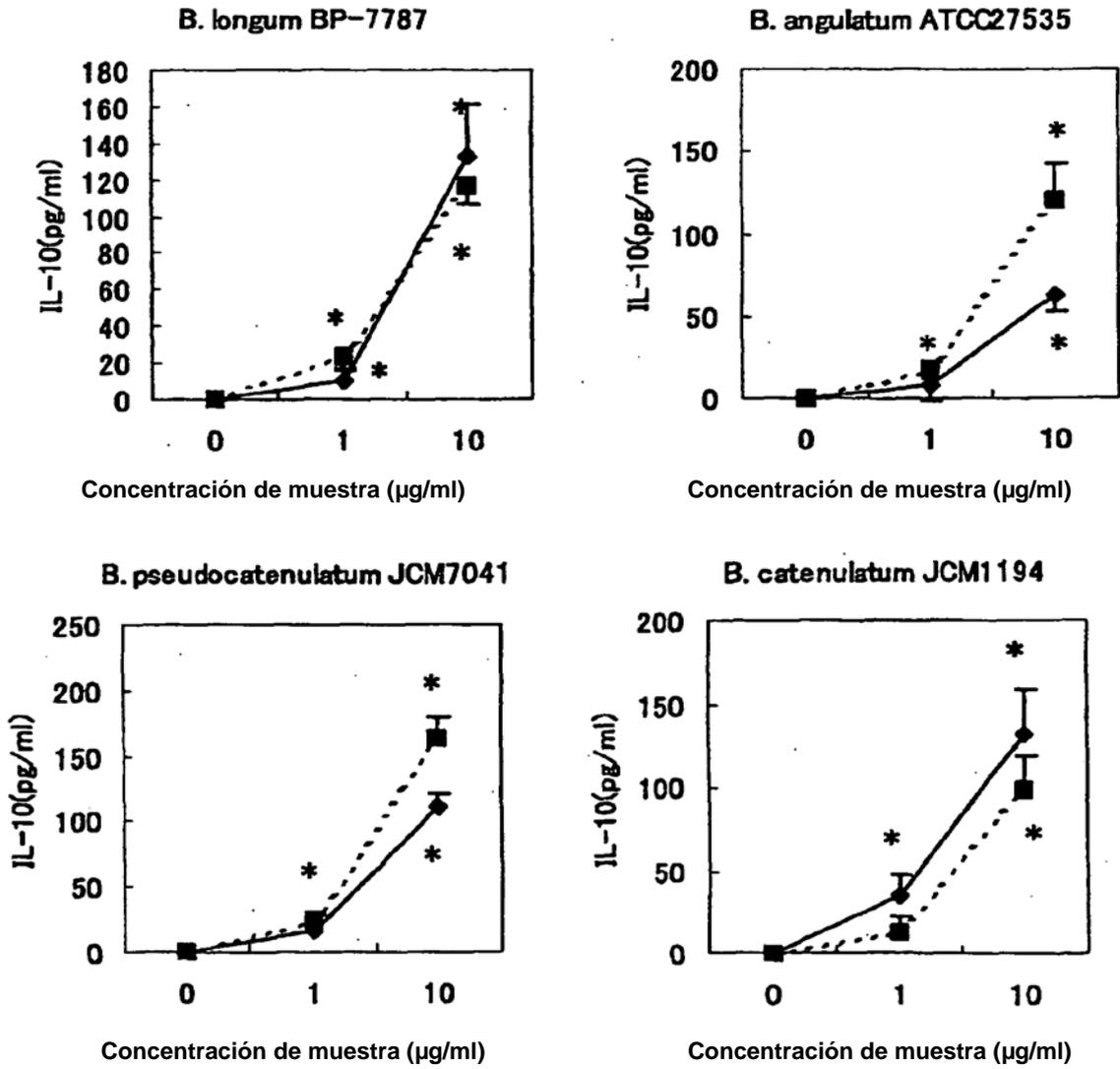


Fig.3

