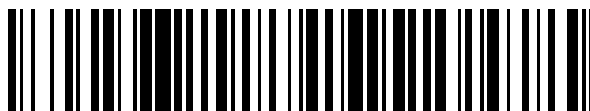


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 150**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)  
**A23L 1/10** (2006.01)  
**A23L 1/105** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61P 37/08** (2006.01)  
**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2009 E 09735409 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2281871**

54 Título: **Bacteria ácido láctica novedosa con actividad anti-alérgica, agente anti-alérgico, alimento y composición farmacéutica que comprenden, cada uno de ellos, la bacteria ácido láctica, y proceso para la producción del agente anti-alérgico**

30 Prioridad:

**25.04.2008 JP 2008115091**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.06.2013**

73 Titular/es:

**KAMEDA SEIKA CO., LTD. (50.0%)**  
**1-1 Kameda Kogyo Danchi 3-chome Konan-ku**  
**Niigata-shi, Niigata 950-0198, JP y**  
**NIIGATA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HARA, TAKASHI;**  
**JOH, TOSHIO;**  
**KUMAGAI, TAKEHISA;**  
**SAITO, MARIKO y**  
**UCHIYAMA, KIMIKO**

74 Agente/Representante:

**MIR PLAJA, Mireia**

**ES 2 407 150 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

Bacteria ácido láctica novedosa con actividad anti-alérgica, agente anti-alérgico, alimento y composición farmacéutica que comprenden, cada uno de ellos, la bacteria ácido láctica, y proceso para la producción del agente anti-alérgico

5

**Campo técnico**

[0001] La presente invención se refiere a una bacteria ácido láctica novedosa, a un agente anti-alérgico que incluye la bacteria ácido láctica, y a un alimento y una composición farmacéutica que incluyen el agente anti-alérgico. Más específicamente, la presente invención se refiere a una cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 que se ha depositado internacionalmente en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Depositario del Organismo Internacional de Patentes con el n.º de accesión FERM BP 11098, a un agente anti-alérgico que comprende la bacteria ácido láctica, y a una composición alimenticia y una composición farmacéutica que comprenden el agente anti-alérgico.

10

15

**Antecedentes de la técnica**

[0002] El número de pacientes que padece alergias está creciendo constantemente. Por ejemplo, resultados de estudios en Japón han informado de que una de cada tres personas padece algún tipo de enfermedad alérgica. Una reducción del número de pacientes que padece una enfermedad alérgica resultante del uso de un alimento tendría una gran importancia social y económica debido a la mejora resultante en la calidad de vida nacional y la gran reducción de los costes médicos.

20

[0003] La IgE es un factor principal en reacciones alérgicas inmediatas (alergia de tipo I), tales como dermatitis atópica, alergia al polen o similares. La producción de IgE se induce por células B que experimentan un cambio de clase de IgE como respuesta a la interleuquina 4 (IL-4). La fuente principal de producción de IL-4 es las células  $T_H2$ . Las células T auxiliares, tales como las células  $T_H1$  y las células  $T_H2$ , se estimulan por la presentación de antígeno de células, tales como células dendríticas, macrófagos o similares, y siguen vías de diferenciación respectivas como respuesta a la influencia de citoquinas, tales como IL-4, IL-12 ó similares. La diferenciación de células  $T_H1$  se induce por la IL-12 y la diferenciación de células  $T_H2$  se induce por la IL-4. Cuando las células  $T_H2$  resultan particularmente dominantes debido al colapso del equilibrio entre células  $T_H1$  y células  $T_H2$  debido a algún motivo, se incrementa el efecto de la IL-4 y se potencia la producción de IgE. En este estado, cuando un antígeno (alérgeno o similar) se une con IgE, se produce un entrecruzamiento entre receptores de IgE de alta afinidad y la degranulación da como resultado la liberación de mensajeros químicos, tales como histamina o similares. Consecuentemente, se producen mediadores lipídicos, tales como leucotrieno, dando como resultado así síntomas alérgicos tipificados por inflamación. Durante la producción potenciada de IgE se observan síntomas alérgicos importantes.

25

30

35

[0004] Los agentes terapéuticos para enfermedades alérgicas son principalmente agentes esteroideos usados como agentes antiinflamatorios, o antagonistas de mensajeros químicos, típicamente agentes anti-histamínicos. Todos estos agentes se usan en tratamientos sintomáticos, y no tienen ninguna función para reducir directamente la cantidad de IgE, que es el factor principal en la patogénesis. Además, los primeros agentes conllevan riesgos asociados a efectos secundarios, tales como somnolencia o sequedad de la boca, y los últimos agentes presentan efectos secundarios, tales como supresión del sistema inmunitario general. Las medicinas que pueden mitigar un estado en el cual las células  $T_H2$  resultan particularmente dominantes, pretenden habilitar una terapia definitiva para las alergias, aunque en la actualidad dichos agentes no se han desarrollado todavía. La terapia de hiposensibilización es un método terapéutico para reducir una cantidad de IgE. Un método de terapia de hiposensibilización es un método terapéutico que mitiga los síntomas mediante la ingestión (o inyección) de un alérgeno, que es la sustancia causal de una enfermedad alérgica, comenzando con una pequeña cantidad e incrementando gradualmente dicha cantidad. Este método terapéutico incluye un riesgo de anafilaxis debido a la administración del alérgeno, y se debe realizar bajo una estricta supervisión médica. En la actualidad, no se puede decir que la terapia de hiposensibilización se haya validado completamente, y queda margen de mejora en relación con la fiabilidad teniendo en cuenta el mucho tiempo requerido para el tratamiento y las diferencias individuales que se observan.

40

45

50

[0005] Teniendo en cuenta estos antecedentes, se ha prestado atención a las bacterias ácido lácticas debido a la buena experiencia en su ingestión como alimento y debido a su función de supresión de la producción de IgE. La acción anti-alérgica de bacterias ácido lácticas es específica de cada cepa. Las bacterias ácido lácticas que presentan este tipo de acción anti-alérgica se seleccionan y se introducen en el mercado en forma de yogur o bebidas con ácido láctico.

55

[0006] Aunque la ingestión diaria continua de bacterias ácido lácticas es necesaria para sacar provecho de la acción anti-alérgica, los sabores individuales pueden impedir el consumo de yogur o bebidas con bacterias ácido lácticas. Además, es improbable que estos alimentos se encuentren en una configuración óptima para su ingestión requerida diaria sin que un consumidor japonés quede saciado. Por contraposición, la esencia de la dieta japonesa es el arroz, y aunque en los últimos años se ha puesto de manifiesto una tendencia a no comer arroz, el mismo es un producto que será siempre ingerido por lo menos en una de cada tres comidas.

60

5 [0007] Una bacteria ácido láctica que presente una acción anti-alérgica se puede combinar con arroz mezclando arroz blanco pulido con una bacteria ácido láctica que se haya cultivado en un tanque independiente o similar. No obstante, debido a que el diámetro y la densidad relativa de las partículas de arroz y las correspondientes de las bacterias ácido lácticas son diferentes, existe un riesgo de que estos componentes se separen durante el almacenamiento, y de que únicamente las bacterias ácido lácticas se hundan hasta el fondo de un recipiente de almacenamiento, tal como una bolsa de arroz o similar. Consecuentemente, no se dará siempre el caso de que el arroz contenga una cantidad deseada de bacterias ácido lácticas ni siquiera cuando se mida una cantidad fija de arroz. Consecuentemente, existen dificultades asociadas a garantizar la ingestión de una cantidad requerida de bacterias ácido lácticas con el fin de que presenten una acción anti-alérgica. Además, aunque se puede usar una técnica en la que la superficie del arroz blanco pulido se recubre con bacterias ácido lácticas, una técnica de este tipo requiere un procesado complicado y provoca incrementos de los costes.

## 15 Exposición de la invención

### Problemas a resolver por la invención

20 [0008] Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar una bacteria ácido láctica con una acción anti-alérgica que se pueda hacer proliferar usando arroz, y en particular arroz blanco pulido, que se pueda recuperar incorporada a la superficie del arroz junto con este último, y que se pueda cocinar e ingerir, además de una composición alimenticia y una composición farmacéutica que usen arroz que contenga una bacteria ácido láctica como ingrediente.

### Medios para resolver los problemas

25 [0009] La presente invención proporciona una cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* (en lo sucesivo en la presente el género *Lactobacillus* se abreviará como "L.") K71, que se ha depositado internacionalmente en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, con el n.º de Acceso FERM BP-11098.

30 [0010] La presente invención proporciona un agente anti-alérgico que comprende la bacteria ácido láctica según la presente invención.

[0011] Las bacterias ácido lácticas en el agente anti-alérgico según la presente invención pueden ser una bacteria viva.

35 [0012] Las bacterias ácido lácticas en el agente anti-alérgico según la presente invención pueden ser una bacteria muerta.

[0013] La presente invención proporciona una composición alimenticia que incluye el agente anti-alérgico según la presente invención.

40 [0014] La presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye el agente anti-alérgico según la presente invención.

45 [0015] La presente invención proporciona una composición alimenticia que incluye arroz fermentado usando la bacteria ácido láctica según la presente invención, un producto pulverizado del arroz, o arroz cocinado obtenido al cocinar el arroz mencionado o el producto de arroz pulverizado.

[0016] La presente invención proporciona un método de fabricación de un agente anti-alérgico, que incluye las etapas de inocular en un medio la bacteria ácido láctica según la presente invención, y de cultivarla.

50 [0017] El medio usado en el método de fabricación del agente anti-alérgico según la presente invención puede ser arroz o un producto de arroz pulverizado.

55 [0018] En la presente invención, el agente anti-alérgico puede ser una medicina que contiene un componente que es una sustancia que presenta una acción de supresión o inhibición de una reacción alérgica. El punto de acción de un agente anti-alérgico incluye, aunque sin limitarse a los mismos, el proceso de diferenciación de células T<sub>H2</sub>, el proceso de presentación de antígenos a las células T<sub>H2</sub>, el proceso de proliferación y activación de las células T<sub>H2</sub>, el proceso en el cual las células B experimentan un cambio de la clase de IgE por interacción con las células T<sub>H2</sub> y maduran en células productoras de IgE, el proceso de diferenciación, proliferación y activación de todos los subconjuntos T auxiliares (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H3</sub> (células T supresoras), T<sub>H17</sub>, T<sub>reg</sub> (células T reguladoras) y similares), y células T citotóxicas, células NKT, y células asesinas naturales, el proceso de regulación inmunológica que incluye la producción de IgE mediada por la acción de subconjuntos T auxiliares (T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H3</sub> (células T supresoras), T<sub>H17</sub>, T<sub>reg</sub> (células T reguladoras) y similares), y células T citotóxicas, células NKT, y células asesinas naturales, el proceso de potenciación de la producción de IgE debido a la presencia de un alérgeno, el proceso de diferenciación, proliferación y activación de

5 células efectoras, tales como mastocitos, basófilos, eosinófilos, y similares, el proceso de síntesis de mensajeros químicos, tales como histamina en las células efectoras, acumulación como gránulos junto con el proceso de una síntesis nueva de mediadores, tales como leucotrieno, el proceso de formación de un compuesto que una un receptor de IgE de alta afinidad en la célula efectora a la IgE y un alérgeno, el proceso de degranulación resultante de la señalización provocada por la formación de un compuesto de este tipo, y el proceso de mensajeros químicos tales como histaminas o leucotrieno liberado como resultado de degranulación que induce anafilaxis localizada en la piel, órganos respiratorios, órganos digestivos, ojos, nariz, y otros diversos órganos.

10 **[0019]** El agente anti-alérgico según la presente invención presenta una acción que suprime o inhibe por lo menos uno de los anteriores procesos. Los puntos de acción del agente anti-alérgico son tales que, aunque el proceso de diferenciación y maduración de las células  $T_H2$  se promueve por la IL-4, la IL-12 suprime el proceso de diferenciación y maduración de células  $T_H2$  promoviendo el proceso de diferenciación y maduración de células  $T_H1$ . De este modo, el proceso de diferenciación y maduración de células  $T_H2$  se puede suprimir mediante la supresión de la producción de IL-4 y promoviendo la producción de IL-12. El agente anti-alérgico según el mecanismo anterior es un agente terapéutico que se puede usar etiotrópicamente en relación con enfermedades alérgicas. Además, se prefiere un agente de este tipo debido a la ausencia de riesgos de efectos secundarios, tales como los asociados a anti-histaminas o agentes esteroideos.

20 **[0020]** La bacteria ácido láctica según la presente invención presenta una acción anti-alérgica, y se ha seleccionado por medio de las pruebas descritas en las siguientes realizaciones, como bacteria ácido láctica que permite una proliferación superior sobre la superficie de arroz blanco pulido. Se puede usar cualquier condición siempre que la condición permita la proliferación de la bacteria, y el cultivo líquido para la bacteria ácido láctica según la presente invención se puede cultivar bajo condiciones de cultivo normales usando un medio normal utilizado para el cultivo de una bacteria ácido láctica (por ejemplo, caldo MRS, o jugos vegetales/de fruta). El pH del medio cuando comience el cultivo está entre 4,0 y 7,0, y preferentemente entre 6,0 y 6,5. La temperatura del cultivo está entre 35 °C y 42 °C, y preferentemente entre 37 °C y 40 °C. Aunque es posible una proliferación suficiente usando un cultivo estático, se prefiere una agitación suave para dispersar uniformemente las bacterias y los componentes de cultivo. A medida que el ácido láctico se acumula en el medio como resultado de la proliferación de bacterias ácido lácticas, el pH del medio cae gradualmente. Aunque se pueden recolectar bacterias ácido lácticas en cierta medida sin el control del pH en el medio, el control del pH del medio se realiza preferentemente mediante la adición de carbonato de calcio al medio o un control automático del pH. Se puede obtener una alta densidad de bacterias ácido lácticas controlando el pH del medio a entre 4,0 y 7,0, y preferentemente a entre 6,0 y 6,5.

35 **[0021]** Tal como se muestra mediante las siguientes realizaciones, se revela claramente una acción anti-alérgica en células microbianas producidas por el calentamiento y destrucción de la bacteria ácido láctica según la presente invención. Por lo tanto, la bacteria ácido láctica contenida en el agente anti-alérgico según la presente invención puede incluir células vivas, más específicamente, microbios que experimenten procesos de propagación y/o metabólicos, o células muertas, más específicamente, microbios que no estén experimentando procesos de propagación o metabólicos. El agente anti-alérgico según la presente invención puede ser un componente de célula microbiana de la bacteria ácido láctica según la presente invención, o puede incluir un componente que presente una acción anti-alérgica.

45 **[0022]** La composición alimenticia según la presente invención puede incluir un componente tal como un condimento, colorante, conservante, u otro componente permitido como producto alimenticio, además del agente anti-alérgico según la presente invención. La composición alimenticia según la presente invención se puede fabricar mediante fermentación usando la bacteria ácido láctica según la presente invención, siempre que se mantenga el efecto del agente anti-alérgico según la presente invención. La fabricación se puede llevar a cabo cocinando, o alternativamente calentando, presurizando o similar, la bacteria ácido láctica según la presente invención y/o un producto fermentado producido con el uso de la bacteria ácido láctica según la presente invención. La bacteria ácido láctica según la presente invención que se hace proliferar mediante cultivo en el líquido se puede usar sin modificaciones, o se puede secar y usar como ingrediente de producto alimenticio que presenta una acción anti-alérgica, o adicionalmente se puede usar como iniciador cuando se fermenta arroz blanco pulido.

55 **[0023]** Cuando se fermenta arroz blanco pulido usando la bacteria ácido láctica según la presente invención, el arroz blanco pulido se lava y a continuación se sumerge en agua, y se fermenta mediante la adición de un iniciador que incluye la bacteria ácido láctica según la presente invención. La bacteria ácido láctica según la presente invención experimenta una proliferación vigorosa a través del uso de los nutrientes en la superficie del arroz, y se adhiere a la superficie del arroz. Consecuentemente, incluso cuando se ha completado la fermentación y el arroz se coloca en un tamiz o similar, y seguidamente se lava en agua, prácticamente la totalidad de las bacterias ácido lácticas permanece incorporada a la superficie del arroz.

60 Entre  $10^8$  y  $10^9$  bacterias ácido lácticas por 1 g de arroz de material sin procesar se incorporan a la superficie del arroz blanco pulido después de completar la fermentación efectuada bajo condiciones apropiadas. Este arroz se puede secar y procesar como arroz de material sin procesar, o se puede obtener arroz cocinado que contiene las bacterias ácido lácticas anti-alérgicas mediante su adición directa a agua y cocinándolo sin secarlo.

**[0024]** La composición farmacéutica según la presente invención puede contener una sustancia que se requiera farmacéuticamente y/o una sustancia permitida para su uso como composición farmacéutica además del agente anti-alérgico según la presente invención.

**[0025]** Según la presente invención, se puede obtener de forma sencilla y rentable arroz blanco pulido que presenta una distribución uniforme de bacterias ácido lácticas anti-alérgicas sobre una superficie del mismo, mediante la fermentación con la bacteria ácido láctica según la presente invención que tiene una acción anti-alérgica, con arroz blanco pulido como material sin procesar. Por lo tanto, se puede proporcionar un alimento esencial que tiene una acción anti-alérgica y que se puede cocinar e ingerir de manera continuada a diario.

### Breve descripción de los dibujos

#### **[0026]**

La FIG. 1 es una gráfica que muestra el efecto de la administración oral repetitiva de bacterias ácido lácticas sobre la IgE total en suero de ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA).

La FIG. 2 es una gráfica que muestra el efecto de la administración oral repetitiva de bacterias ácido lácticas sobre niveles de IgE específicos de la ovoalbúmina en ratones sensibilizados con OVA.

La FIG. 3 es una gráfica que muestra el efecto de la administración oral repetitiva de bacterias ácido lácticas sobre la producción de IL-4 en células esplénicas de ratones sensibilizados con OVA.

La FIG. 4 es una gráfica que muestra el efecto de la administración oral repetitiva de bacterias ácido lácticas sobre la producción de IgE en células esplénicas de ratones sensibilizados con OVA.

La FIG. 5 es una gráfica que muestra el efecto de la administración oral repetitiva de bacterias ácido lácticas sobre la IgE total en suero en un animal modelo con dermatitis atópica.

La FIG. 6 es una gráfica que muestra el efecto de la administración oral repetitiva de bacterias ácido lácticas sobre síntomas alérgicos auriculares en un animal modelo con dermatitis atópica.

### Modo preferido para llevar a cabo la invención

**[0027]** La presente invención se describirá de forma detallada en lo sucesivo, con respecto a las realizaciones de la presente invención. No obstante, la presente invención no queda limitada en modo alguno por estas realizaciones.

#### Ejemplo 1

**1. Selección de bacterias ácido lácticas que tienen una acción anti-alérgica y que presentan una proliferación superior sobre la superficie de arroz blanco pulido.**

##### **(1) Fuente de bacterias ácido lácticas usadas en la selección**

**[0028]** Las bacterias ácido lácticas usadas en la selección se han separado recientemente de productos alimenticios fermentados usando arroz como material sin procesar (incluyendo cascarilla de arroz en polvo, pasta de alubias arroz malteadas, heces de sake, y pasta de fermentación). En la Tabla 1 se muestran los nombres de 39 cepas bacterianas ácido lácticas de las que se confirmó que pertenecían al estudio preliminar del género Lactobacillus.

##### **(2) Evaluación in vitro de la acción anti-alérgica de bacterias ácido lácticas**

**[0029]** Células del bazo extraídas de ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) se usaron para efectuar pruebas anti-alérgicas in vitro. Tres ratones hembra adquiridos con seis semanas de edad (Balb/c, Charles River) se alojaron bajo condiciones SPF y se sometieron a una inyección intraperitoneal de 0,5 mL de una suspensión de 1 mg/mL de Al(OH)<sub>3</sub> y 2 mg/mL de OVA por ratón a una frecuencia de una vez por semana. Después de esto, se extrajo sangre apropiadamente de la vena caudal para confirmar la IgE total en suero y el nivel de IgE específico de la OVA. La medición de la IgE total en suero y la IgE específica de la OVA se realizó por medio de un método ELISA de tipo sándwich usando un conjunto Murine Opt EIA ELISA fabricado por Becton Dickinson Co., Ltd. Más específicamente, cuando se mide la IgE total en suero, se adiciona suero sanguíneo diluido adecuadamente, a una placa recubierta con anticuerpo monoclonal, de rata, anti-IgE de ratón, como anticuerpo primario, y a continuación se usan anticuerpos monoclonales, de rata, biotinilados, de cadena pesada, anti-IgE de ratón, como anticuerpo secundario. Cuando se mide la IgE específica de la OVA, se realiza un ELISA de la misma manera usando una placa recubierta con OVA como anticuerpo primario sustituto. Se seleccionan los individuos que presentan el nivel más alto tanto de IgE total en suero

como de IgE específica de la OVA, y se efectúa una escisión del bazo 28 días después del inicio del cultivo. El bazo escindido se disecciona finamente usando un escalpelo, se adicionó un tampón de lisis de glóbulos rojos (154 mM de cloruro de amonio, 14 mM de bicarbonato de sodio, y 0,11 mM de EDTA-2NA, pH 7,3), y se extraen los glóbulos rojos. Después de una dilución a  $2 \times 10^6$  células/mL en medio RPM 1640 que contenía suero de ternera fetal al 10 % (Difco), penicilina G (100U/mL), estreptomycin (100 mg/mL) y HEPES 10 mM, se dispensaron títulos de 100  $\mu$ L en una placa de microtitulación de 96 pocillos. A continuación, se adicionaron 20  $\mu$ L de una suspensión de bacterias ácido lácticas muertas por calor (1 mg/mL) y 80  $\mu$ L de una solución de OVA (1 mg/mL). Después de un cultivo durante 7 días en una atmósfera de dióxido de carbono al 5 % y una temperatura de 37 °C, las células del bazo y las bacterias ácido lácticas se extrajeron por centrifugación del líquido de cultivo. Las concentraciones respectivas de IL-4 e IL-12 en el sobrenadante se midieron usando IL-4 de Ratón (n.º de catálogo 555232) e IL-12 de Ratón (p 70, n.º de catálogo 555256) de un conjunto Mouse Opt EIA ELISA fabricado por Becton Dickinson Co., Ltd.

### (3) Pruebas de proliferación de bacterias ácido lácticas con respecto a superficie de arroz blanco pulido

[0030] 50 g del arroz blanco pulido se lavan, y se sumergen en 100 mL de agua destilada. Un mL de un líquido de cultivo de una noche, de bacterias ácido lácticas (aproximadamente  $10^9$ /mL) a 37 °C en caldo MRS se adiciona al líquido de inmersión y la mezcla se mantiene a una temperatura de 38 °C durante un día. El agua se descarta, y después de realizar tres veces un lavado usando aproximadamente 100 mL de agua destilada, el arroz fermentado se pulveriza, y las bacterias ácido lácticas incorporadas a la superficie del arroz se liberan y suspenden. La pulverización del arroz fermentado se llevó a cabo colocando 10 g del arroz fermentado junto con 90 mL de solución salina fisiológica estéril (NaCl 0,85 %) en una bolsa estéril provista de un filtro designado, conectándola a un *stomacher* (Organo. Stomacher 400-T), y pulverizando mediante una operación a 230 rpm durante 120 segundos. El arroz fermentado y pulverizado se diluye adecuadamente, se extiende sobre un medio de LBS agar (BBL) y se cultiva para calcular así la cantidad de bacterias ácido lácticas incorporadas a la superficie de arroz blanco pulido de acuerdo con el número resultante de colonias.

### (4) Resultados

[0031] En la Tabla 1 se muestran la actividad anti-alérgica y los resultados de las pruebas de proliferación de incorporación usando arroz blanco pulido.

[Tabla 1]

Nombre de cepa bacteriana	Concentración de citoquinas (pg/m)		Proliferación de arroz blanco pulido ( $\times 10^8$ cfu/g)
	IL 4	IL 12	
<i>L.casei subesp. casei</i> K327	242 $\pm$ 50	148 $\pm$ 92	
<i>L.casei subesp. casei</i> K379	159 $\pm$ 39	334 $\pm$ 88	
<i>L.casei subesp. casei</i> K409	104 $\pm$ 7	172 $\pm$ 51	
<i>L.casei subesp. casei</i> K508	250 $\pm$ 14	179 $\pm$ 84	
<i>L.casei subesp. casei</i> K924	152 $\pm$ 62	241 $\pm$ 74	
<i>L. fermentum</i> K1016	137 $\pm$ 35	275 $\pm$ 120	
<i>L. parabuchineri</i> K17	203 $\pm$ 36	106 $\pm$ 65	
<i>L. paracasei</i> K101	196 $\pm$ 20	256 $\pm$ 42	
<i>L. paracasei</i> K102	175 $\pm$ 39	244 $\pm$ 84	
<i>L. paracasei</i> K11	202 $\pm$ 28	321 $\pm$ 137	
<i>L. paracasei</i> K110	151 $\pm$ 74	274 $\pm$ 89	
<i>L. paracasei</i> K111	155 $\pm$ 1	92 $\pm$ 7	
<i>L. paracasei</i> K112	88 $\pm$ 40	358 $\pm$ 119	0,2
<i>L. paracasei</i> K115	79 $\pm$ 17	351 $\pm$ 32	1,2
<i>L. paracasei</i> K121	153 $\pm$ 44	203 $\pm$ 101	
<i>L. paracasei</i> K122	58 $\pm$ 11	996 $\pm$ 109	0,6
<i>L. paracasei</i> K142	86 $\pm$ 19	348 $\pm$ 26	0,9
<i>L. paracasei</i> K21	169 $\pm$ 58	206 $\pm$ 55	
<i>L. paracasei</i> K41	254 $\pm$ 35	125 $\pm$ 57	
<i>L. paracasei</i> K61	204 $\pm$ 111	164 $\pm$ 27	
<i>L. paracasei</i> K62	130 $\pm$ 26	216 $\pm$ 18	
<i>L. paracasei</i> K70	165 $\pm$ 27	98 $\pm$ 27	
<i>L. paracasei</i> K71	69 $\pm$ 17	1.183 $\pm$ 188	6,2
<i>L. paracasei</i> K72	164 $\pm$ 5	169 $\pm$ 51	

Nombre de cepa bacteriana	Concentración de citoquinas (pg/m)		Proliferación de arroz blanco pulido (x 10 <sup>8</sup> cfu/g)
	IL 4	IL 12	
<i>L. paracasei</i> K91	203 ± 33	222 ± 94	
<i>L. pentosus</i> K258	87 ± 43	524 ± 192	0,2
<i>L. plantarum</i> K124	100 ± 29	677 ± 212	0,4
<i>L. plantarum</i> K 139	83 ± 18	465 ± 87	0,3
<i>L. plantarum</i> K 158	79 ± 33	595 ± 79	0,01
<i>L. plantarum</i> K198	88 ± 5	513 ± 212	0,2
<i>L. plantarum</i> K199	123 ± 47	706 ± 353	
<i>L. plantarum</i> K204	99 ± 31	547 ± 63	0,9
<i>L. plantarum</i> K246	87 ± 5	501 ± 287	0,004
<i>L. plantarum</i> K413	115 ± 11	512 ± 9	
<i>L. plantarum</i> K721	74 ± 6	337 ± 191	0,08
<i>L. plantarum</i> K79	92 ± 20	559 ± 134	0,02
<i>L. reuteri</i> K141	256 ± 81	111 ± 4	
<i>L. reuteri</i> K142	281 ± 63	94 ± 56	
<i>L. sake</i> K244	57 ± 11	800 ± 161	0,04

[0032] Tal como se muestra en la Tabla 1, de las 39 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos alimenticios fermentados usando arroz como material sin procesar, 15 cepas presentaron una reducción conspicua en la concentración de IL-4 y un aumento conspicuo en la concentración de IL-12. La IL-4 promueve la diferenciación y la maduración de células T<sub>H2</sub>. Por otro lado, la IL-12 suprime la diferenciación y la maduración de células T<sub>H2</sub> promoviendo la diferenciación y la maduración de células T<sub>H1</sub>. Cuando las células T<sub>H2</sub> se hacen particularmente dominantes debido a un colapso de equilibrio entre células T<sub>H1</sub> y células T<sub>H2</sub>, el entorno de alta concentración de IL-4 potencia la producción de IgE e induce un estado alérgico. Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas que suprimen la producción de IL-1 y promueven la producción de IL-12 mitigan un estado en el cual las células T<sub>H2</sub> son dominantes, es decir, dichas bacterias tienen una acción anti-alérgica. La cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 de las 15 cepas de bacterias ácido lácticas que presentan una fuerte acción anti-alérgica presenta una proliferación superior en relación con el arroz blanco pulido, y se recupera fácilmente debido a la fuerte adherencia de la superficie del arroz blanco pulido. De este modo, la cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 se seleccionó como la cepa óptica para el objetivo de la presente invención. En lo sucesivo, en la presente, a la cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 se le hará referencia como bacteria ácido láctica según la presente invención. La bacteria ácido láctica según la presente invención se aisló a partir de heces de sake y se ha depositado internacionalmente en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales y Avanzadas, Depositario del Organismo Internacional de Patentes bajo el n.º de Acceso FERM BP 11098.

## 20 Ejemplo 2

### 2. Caracterización de la bacteria ácido láctica según el análisis de la presente invención de la secuencia de ARNr 16S

[0033] En la Secuencia n.º 1 se muestra la secuencia de un fragmento de polinucleótido en la región genética del ARN ribosómico 16S (al que en lo sucesivo se hará referencia como "ARNr") de un microorganismo amplificado de acuerdo con un método conocido por aquellos con conocimientos habituales en la materia, usando un ADN molde microbiano de la cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 según la presente invención. Hay más de 489.840 tipos de ARNr 16S microbiano. Después del alineamiento, se han usado secuencias de longitud completa o secuencias parciales de dicho ARNr para crear una base de datos y las mismas se pueden usar a través del Ribosomal Database Project II ((RDP II, <http://rdp.cme.msu.edu/>) (Versión 9.59, en vigor el 5 de marzo de 2008)) (Maidak, B. L. et al. 2001, Nucleic Acids Res., 29, pp. 173-174). Como resultado de buscar en la anterior base de datos usando la secuencia en el n.º de Secuencia 1, se halló un 100 % de homología con una secuencia nucleotídica de un gen ARNr 16S en la cepa JCM8130 de *L. paracasei* subespecie *paracasei*, que es una variedad de *L. paracasei*, y se halló un 99,9 % de homología con la cepa NBRC 15906 de *L. paracasei* subespecie *tolerans*. Aunque la búsqueda de homología demuestra que la secuencia nucleotídica de la Secuencia n.º 1 tiene una alta homología con la secuencia nucleotídica en el gen ARNr 16S de la cepa ATCC334 de *L. casei*, el artículo de Dellaglio, F. et. Al. asevera que esta es la misma para cada cepa de *L. paracasei* (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52:285 287 (2002)). No obstante, puesto que se supone que hay una fuerte posibilidad de que la cepa ATCC334 de *L. casei* también pertenezca a *L. paracasei*, el hecho de que la cepa ATCC334 de *L. casei* se hallase en una búsqueda de homología no permite llegar a la conclusión de que la bacteria ácido láctica según la presente invención pertenece a *L. casei*. Se realiza un análisis de conglomerados en relación con secuencias nucleotídicas para genes ARNr 16S microbianos que tienen aciertos significativos en búsquedas de homología en relación con cepas que no sean la cepa ATCC334 de *L. casei*, la secuencia nucleotídica en

la Secuencia n.º 1 pertenece a un conglomerado que forma dos variedades de *L. paracasei*, y es la misma secuencia que la secuencia nucleotídica correspondiente a genes ARNr 16S en *L. paracasei* subespecie *paracasei*. Por lo tanto, la bacteria ácido láctica según la presente invención, de acuerdo con los resultados analíticos de las secuencias nucleotídicas de genes ARNr 16S, revela una fuerte posibilidad de pertenecer a *L. paracasei* a un nivel de especie.

5

### Pruebas fisiológicas y bioquímicas

[0034] En las Tablas 2, 3, y 4 siguientes se muestran los resultados de varias pruebas fisiológicas y bioquímicas llevadas a cabo sobre la cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 según la presente invención.

10

**[Tabla 2]**  
Resultados de la prueba de la primera fase

Elemento bajo prueba	<i>Lactobacillus paracasei</i> K71	
Temperatura de cultivo (° C)	30	
Morfología celular	bacilo (0,8-0,9 x 1,5-2,5 (m)	
Coloración de gram	+	
Esporulación	-	
Motilidad	-	
Morfología de las colonias	medio: agar M RS	
	tiempo de cultivo: 24 h	
	diámetro: 1,0-2,0 mm	
	color: blanco lechoso	
	forma: circular	
	elevación: lenticular	
	borde: entero	
	superficie: lisa	
Prueba de proliferación a (°C)	37	+
	45	+
Catalasa	+	
Oxidasa	+	
Ácido/gas de glucosa (producción de ácido/producción de gas)	+/-	
Prueba de O/F (oxidación/fermentación)	+/+	

+: positivo, -: negativo

**[Tabla 3]**

Resultados de la prueba de fermentación (segunda fase)			
Cepa <i>Lactobacillus paracasei</i> K71			
glicerol	-	salicina	+
eritritol	-	celobiosa	+
D-arabinosa	-	maltosa	+
L-arabinosa	-	Jactose	+
ribosa	+	melibiosa	-
D-xilosa	-	sacarosa	+
L-xilosa	-	trehalosa	+
adonitol	+	inulina	-
β-m-etil-D-xilósido	-	melicitosa	+
galactosa	+	rafinosa	-
glucosa	+	almidón	-
fructosa	+	glucógeno	-
manosa	+	xilitol	-
sorbosa	-	gentiobiosa	-
ramnosa	-	D-turanosa	+
dulcitol	-	D-lixosa	-
inositol	-	D-tagatosa	+
manitol	+	D-fucosa	-



Resultados de la prueba de fermentación (segunda fase)			
Cepa <i>Lactobacillus paracasei</i> K71			
sorbitol	-	L-fucosa	-
$\alpha$ -metil-D-manósido	-	D-arabitol	-
$\alpha$ -metil-D-glucósido	+	L-arabitol	-
N-acetilglucosamina	+	gluconato	+
amigdalina	+	cetogluconato	-
arbutina	+	5-cetogluconato	-
esculina	+		

**[Tabla 4]**

Pruebas de proliferación:

10 °C	+
40 °C	+
45 °C	+

5 **[0035]** Los resultados de la prueba bacteriana de primera fase mostrada en la Tabla 2 revelan que la bacteria ácido láctica según la presente invención es un bacilo gram-positivo no móvil que fermenta glucosa, y es tanto catalasa como oxidasa negativa. Estas características se corresponden con las características generales de un bacilo ácido láctico, tal como *L. paracasei* según sugiere el análisis de secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S. Los resultados de las pruebas bacterianas de segunda fase mostrados en la Tabla 3 revelan que la bacteria ácido láctica según la presente invención fermenta ribosa, adonitol, galactosa, fructosa, dulcitol, y similares, y no fermenta glicerol, D-arabinosa, ramnosa, inositol, y similares. Los resultados de la prueba de proliferación mostrados en la Tabla 4 revelan que la bacteria ácido láctica según la presente invención se hizo proliferar a 10 °C. Se cree que estas características coinciden con las características típicas de *L. paracasei* (Collins, M. D. et. Al., Int. J. Syst. Bacteriol., 39: 105-108 (1989), según sugiere el análisis de secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S. Por lo tanto, los resultados de las diversas pruebas fisiológicas y bioquímicas muestran claramente una alta posibilidad de que la bacteria ácido láctica según la presente invención pertenezca a la *L. paracasei* subespecie *paracasei* en el nivel de las subespecies.

**Ejemplo 3**

20 **[0036]** Evaluación in vivo de la acción anti-alérgica de la bacteria ácido láctica según la presente invención

**(1) Efecto sobre ratones sensibilizados a alérgenos**

25 **[0037]** Usando el método que se describe más abajo, se examinaron la IgE resultante de la administración oral repetitiva a ratones sensibilizados a alérgenos, de la cepa *Lactobacillus paracasei* K71, es decir, la bacteria ácido láctica según la presente invención, y la producción de citoquinas (IL-4) que afecta a alergias.

30 **[0038]** Dieciocho ratones hembra (Balb/c) con seis semanas de edad se adquirieron en Charles River Inc., y se alojaron en un entorno convencional. Después de 4 días de aclimatación, los ratones se dividieron en tres grupos de seis ratones, y a uno de los grupos se les dio repetitivamente mediante administración oral diaria 50  $\mu$ L de una suspensión microbiana (20 mg/mL) de la cepa *Lactobacillus paracasei* K71, es decir, la bacteria ácido láctica según la presente invención. Una semana después de iniciar la administración, se extrajo sangre con una frecuencia de una vez por semana, de la vena caudal, y después de esto se inyectaron intraperitonealmente  $Al(OH)_3$  y OVA usando el mismo método que en el EJEMPLO 1. El 42° día después de comenzar las pruebas, se extrajo el bazo después de completar la extracción de sangre usando el mismo método que en el EJEMPLO 1, y se muestrearon células esplénicas. Se realizaron la misma extracción de sangre y la misma extracción de bazo en relación con un grupo sensibilizado que recibía una administración oral diaria de agua destilada en sustitución de una suspensión bacteria ácido láctica junto con inyecciones intraperitoneales semanales de una suspensión de  $Al(OH)_3$  y OVA, y un grupo no sensibilizado que recibía una administración oral de agua destilada, y que no recibía inyecciones intraperitoneales de una suspensión de  $Al(OH)_3$  y OVA.

40 **[0039]** Las muestras de plasmas extraídas se analizaron en relación con la IgE total en suero y los niveles de IgE específicos de OVA usando el mismo método que el descrito en el EJEMPLO 1. Después de adicionar 100  $\mu$ g/mL de OVA, las células esplénicas se cultivaron. Se analizó la cantidad de IL-4 e IL-12 en el sobrenadante después de 7 días, y se analizó la IgE total después de 14 días. En la FIG. 1 se muestra el efecto de la administración oral repetitiva de las bacterias ácido lácticas sobre la IgE total en suero en ratones sensibilizados con OVA, y en la FIG. 2 se muestra el efecto sobre niveles de IgE específicos de ovoalbúmina. En la FIG. 3 se muestra el efecto de la administración oral repetitiva de la bacteria ácido láctica sobre la producción de IL-4 en el sobrenadante de células esplénicas de ratones sensibilizados con OVA, y en la FIG. 4 se muestra el efecto de la administración oral repetitiva de la bacteria ácido láctica sobre la IgE total en el sobrenadante de células esplénicas de ratones sensibilizados con OVA. En las FIGs. 1 a 4, las notaciones (a) y (b) indican que la diferencia entre los grupos bajo las dos condiciones de prueba es

estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ), y la notación (c) indica una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para el grupo bajo condiciones experimentales (c) con respecto a cualquiera de los grupos bajo condiciones experimentales (a) o (b). Tal como se muestra en las FIGs. 1 a la FIG. 4, se produce un incremento significativo de la IgE total en suero (FIG. 1) y la IgE específica de ovoalbúmina (FIG. 2) resultantes de la sensibilización a alérgenos. No obstante, los incrementos se suprimen significativamente mediante la administración repetitiva de bacterias ácido lácticas. De una manera similar, la administración oral repetitiva de bacterias ácido lácticas provoca una reducción significativa en la producción de IL-4 (FIG. 3), y la producción de IgE total (FIG. 4) en células esplénicas. La diferencia estadísticamente significativa entre los grupos sujetos a cada condición experimental se verificó usando PLSD de Fisher en relación con diferencias significativas en un análisis de varianza de una vía, con el uso de Statcel, el cual es un software complementario para EXCEL, el software de hojas de cálculo de Microsoft Corporation.

#### Ejemplo 4

##### Efecto sobre un animal modelo con dermatitis atópica

[0040] El efecto, sobre la progresión de dermatitis atópica, de la administración oral repetitiva de la cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 según la presente invención se examinó usando un ratón NC, el cual es un animal modelo para dermatitis atópica. Se adquirieron en Charles River Inc. doce ratones hembra (Balb/c) de cinco semanas de edad, y los mismos se sometieron a tres días de aclimatación usando pienso CE-2 (CLEA Japon Inc.), y a continuación se separaron en dos grupos de seis ratones. A un grupo se le dio pienso CE-2 que contenía un 0,05 % de bacterias deshidratadas de la cepa *Lactobacillus paracasei* K71 (grupo al que se le administran bacterias ácido lácticas) y al otro grupo se le dio pienso CE-2 normal (grupo de control). La alimentación continuó durante tres días.

[0041] La sensibilización a alergia se realizó usando cloruro de picrilo (2,4,6-trinitroclorobenceno, usado después de la re-cristalización). La sensibilización inicial se llevó a cabo aplicando un recubrimiento de una solución de cloruro de picrilo al 5 % (disuelto en etanol: acetona = 4:1) sobre el abdomen y las yemas de cuatro extremidades. Después de cuatro días, se repitió el recubrimiento sobre la oreja a una frecuencia de una vez por semana para un total de 8 administraciones usando solución de cloruro de picrilo al 1 % (disuelta en aceite de oliva comestible). La extracción de sangre y el análisis de la IgE total en suero se realizó apropiadamente usando el método descrito en el EJEMPLO 1. Durante todo el periodo de cultivo, se asignó una evaluación de puntuación clínica a ambas orejas (seis personas encargadas de la evaluación llevaron a cabo la puntuación de acuerdo con el patrón de evaluación de la Tabla 5 y expresado en una puntuación total para las orejas tanto derecha como izquierda).

[Tabla 5]	
Puntuación Clínica	Signos
1	sin síntomas
2	forma auricular normal, con costras
3	hemorragia en el pabellón auricular, ligero cambio de la forma auricular
4	rágades en el pabellón auricular, excoriación conspicua
5	rágades conspicuas en el pabellón auricular

[0042] La dosis media de bacterias ácido lácticas en el grupo al que se le administraron bacterias ácido lácticas se calculó a partir de la cantidad ingerida de pienso y se estimó que fue de 23 mg/ratón/día. El efecto de la administración oral repetitiva de las bacterias ácido lácticas sobre la IgE total en suero en el animal modelo para la dermatitis atópica se muestra en la FIG. 5, y el efecto de la administración oral repetitiva de las bacterias ácido lácticas sobre síntomas alérgicos auriculares en un animal modelo con dermatitis atópica se muestra en la FIG. 6. En la FIG. 5 y la FIG. 6, el símbolo \* muestra  $P < 0,05$  y el símbolo \*\* muestra  $P < 0,01$ . En el grupo al que se le administraron bacterias ácido lácticas, tanto la cantidad de IgE (FIG. 5) como la puntuación clínica (FIG. 6) se redujeron significativamente en comparación con el grupo de control, y confirma que la administración de bacterias ácido lácticas reduce claramente los síntomas de dermatitis atópica. Los resultados de la prueba t de Student muestran que tanto la IgE total en suero como la puntuación clínica del grupo al que se le administraron bacterias ácido lácticas se redujeron significativamente en comparación con el grupo de control, y por lo tanto confirman que la administración de bacteria ácido láctica según la presente invención reduce claramente los síntomas de la dermatitis atópica.

#### Ejemplo 5

##### 3. Evaluación sensorial de arroz cocinado

[0043] Tres tandas (aproximadamente 450 g) de arroz blanco pulido (arroz Koshihikari de la Prefectura de Niigata) se lavaron y se sumergieron en 900 mL de agua destilada. Se adicionaron nueve mL de líquido de cultivo durante una noche, cultivado a 37 °C en caldo MRS, y los mismos se mezclaron suavemente, y se mantuvieron a una temperatura de 38 °C durante un día. Después de esto, el agua se descartó, y después de realizar tres veces un lavado usando aproximadamente 500 mL de agua destilada, se adicionó una cantidad adecuada de agua destilada y la mezcla se colocó en una arrocera eléctrica. Se recogió una pequeña cantidad del arroz antes de cocinarlo para medir el número de

bacterias ácido lácticas usando la misma operación que el EJEMPLO 1. Como resultado, se detectaron  $4,3 \times 10^8$  bacterias ácido lácticas por 1 g de arroz (conversión peso seco). La cocción se llevó a cabo bajo condiciones normales, y la evaluación sensorial del arroz cocinado muestra que el mismo era un arroz exquisito en modo alguno inferior al arroz cocinado normal.

5

**LISTADO DE SECUENCIAS**

**[0044]**

10

<110> KAMEDA SEIKA CO., LTD. NIIGATA UNIVERSITY

<120> Novel Lactobacillus Microbe, Antiallergic Agent, Food and Pharmaceutical Composition Containing Thereof, and Method for Manufacturing the Antiallergic Agent

15

<130> KMSF-001PCT

<150> JP2008-115091

<151> 2008-4-25

20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

25

<210> 1

<211> 1530

<212> DNA

<213> Lactobacillus paracasei

30

<400> 1

# ES 2 407 150 T3

gagtttgatc ctggctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgaacg	60
agttctcggt gatgatcggg gcttgccaccg agattcaaca tggAACgagt ggCGgacggg	120
tgagtaacac gtgggtaacc tgcccttaag tgggggataa catttgaaa cagatgctaa	180
taccgcatag atccaagaac cgcAtggTtc ttggctgaaa gatggcgtaa gctatcgctt	240
ttggatggac ccgCGcgta ttagctagtt ggtgaggtaa tggctacca aggcgatgat	300
acgtagccga actgagaggt tgatcggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct	360
acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgcaa gtctgatgga gcaacgCGc	420
gtgagtgaag aaggctttcg ggtcgtaaaa ctctgttgtt ggagaagaat ggtcggcaga	480
gtaactgttg tcggcgtgac ggtatccaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca	540
gccgCGtaa tacgtaggTg gcaagcgTta tccggattta ttggcgtaa agcGagcgca	600
ggcggTtttt taagtctgat gtgaaagccc tcggcttaac cgaggaagcg catcggaaac	660
tgggaaactt gAgTgcagaa gaggacagTg gaactccatg tGtagcggtg aaatGcgtag	720
atatatggaa gaacaccagT ggCGaaggcg gctgtctggt ctgtaactga cgctgaggct	780
cGaaagcatg ggtagcgaac aggattagat accctgtag tccatgCGt aaacgatgaa	840
tGctaggTgt tggaggTtt ccgCCcttca gtgCCgCagc taacgatta agcattccgc	900
ctggggagta cGaccgcaag gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcg	960
tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatctttt	1020
gatcaactga gagatcaggt tccccctcg ggggcaaaat gacaggtggt gcatggttgt	1080
cgtcagctcg tGtcgtgaga tGttgggtta agtcccGcaa cGagcGcaac ccttatgact	1140
agttGCCagc atttagttg gcaactctagT aagactgCG gtgacaaacc ggaggaaggt	1200
ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctggc tacacacgtg ctacaatgga	1260
tgttacaacg agttgcgaga ccgCGaggTc aagctaactc cttaaagcca ttctcagTtc	1320
ggactgtagg ctgcaactcg cctacacgaa gtCGgaatcg ctagtaatcg cggatcagca	1380
cGccgCGgtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg	1440
taacaccCGa agccggTggc gtaacccttt tagggagcga gccgtctaag gtgggacaaa	1500
tgattagggt gaagtcgtaa caagtagcc	1530

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cepa de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* K71 depositada internacionalmente en el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industriales Avanzadas, Depositario del Organismo Internacional de Patentes bajo el n.º de Acceso FERM BP 11098.
2. Agente anti-alérgico que comprende la bacteria según la reivindicación 1.
- 10 3. Agente según la reivindicación 2, en el que la bacteria es una bacteria viva.
4. Agente según la reivindicación 2, en el que la bacteria es una bacteria muerta.
5. Composición alimenticia que incluye el agente según una cualquiera de la reivindicación 2 a la reivindicación 4.
- 15 6. Composición farmacéutica que incluye el agente según una cualquiera de la reivindicación 2 a la reivindicación 4.
7. Composición alimenticia que incluye arroz fermentado usando la bacteria según la reivindicación 1, un producto pulverizado del arroz, o arroz cocinado obtenido al cocinar el anterior arroz o el producto de arroz pulverizado.
- 20 8. Método de fabricación de un agente anti-alérgico que comprende las etapas de inocular en un medio la bacteria según la reivindicación 1, y cultivarla.
9. Método según la reivindicación 8, en el que el medio es arroz o un producto de arroz pulverizado.

FIG. 1

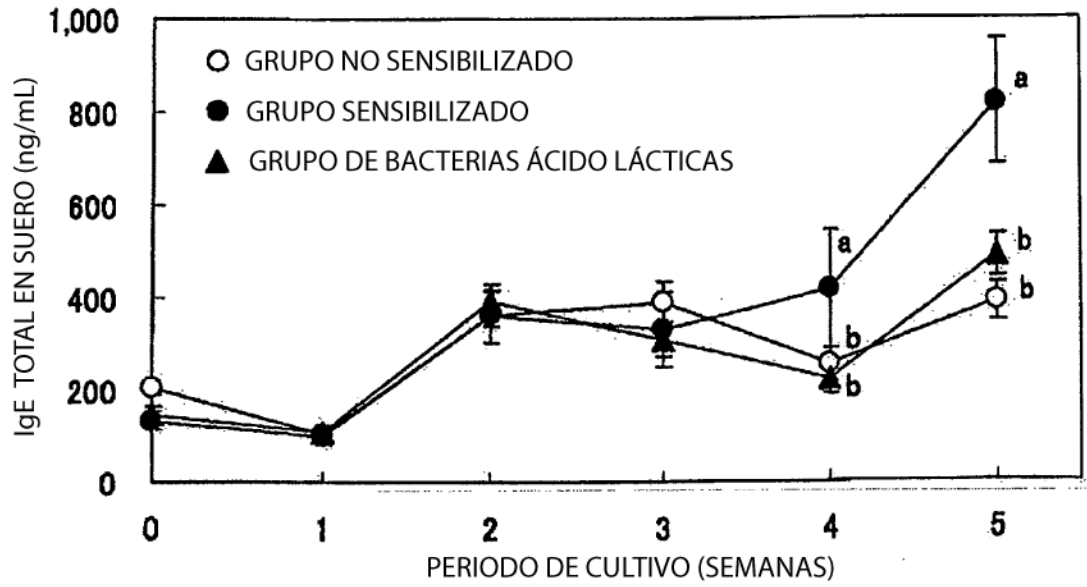


FIG. 2

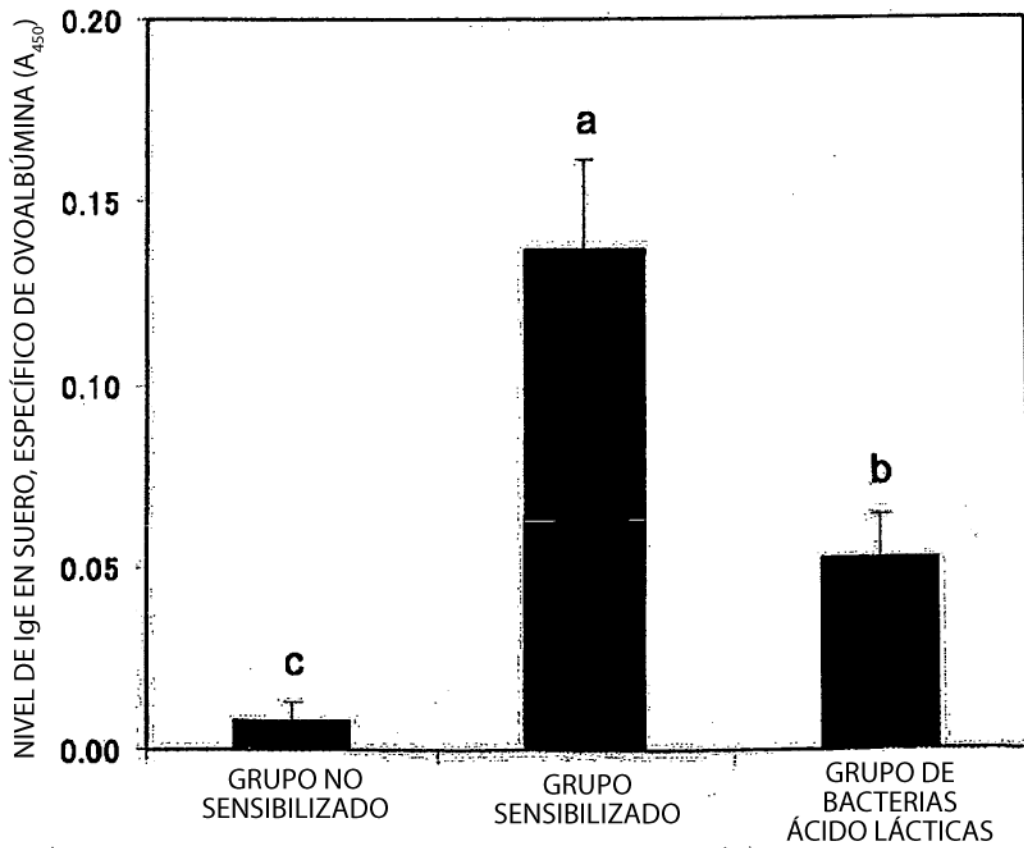


FIG. 3

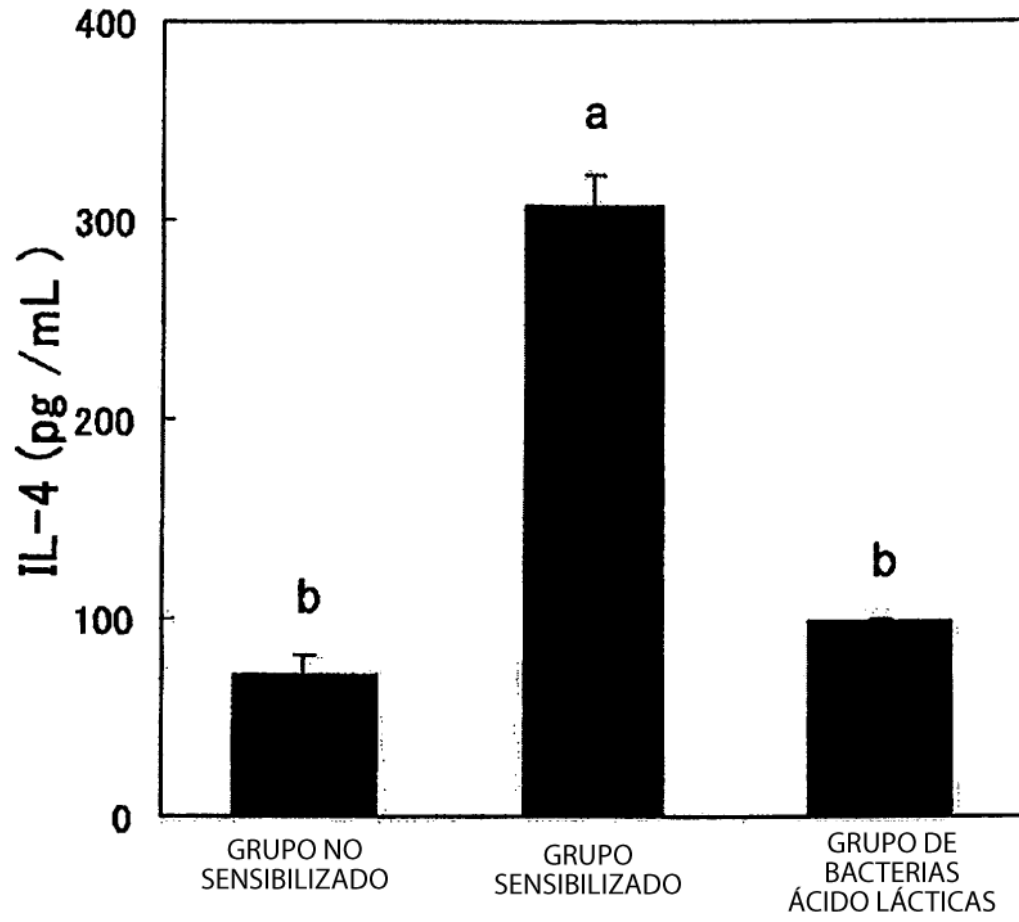


FIG. 4

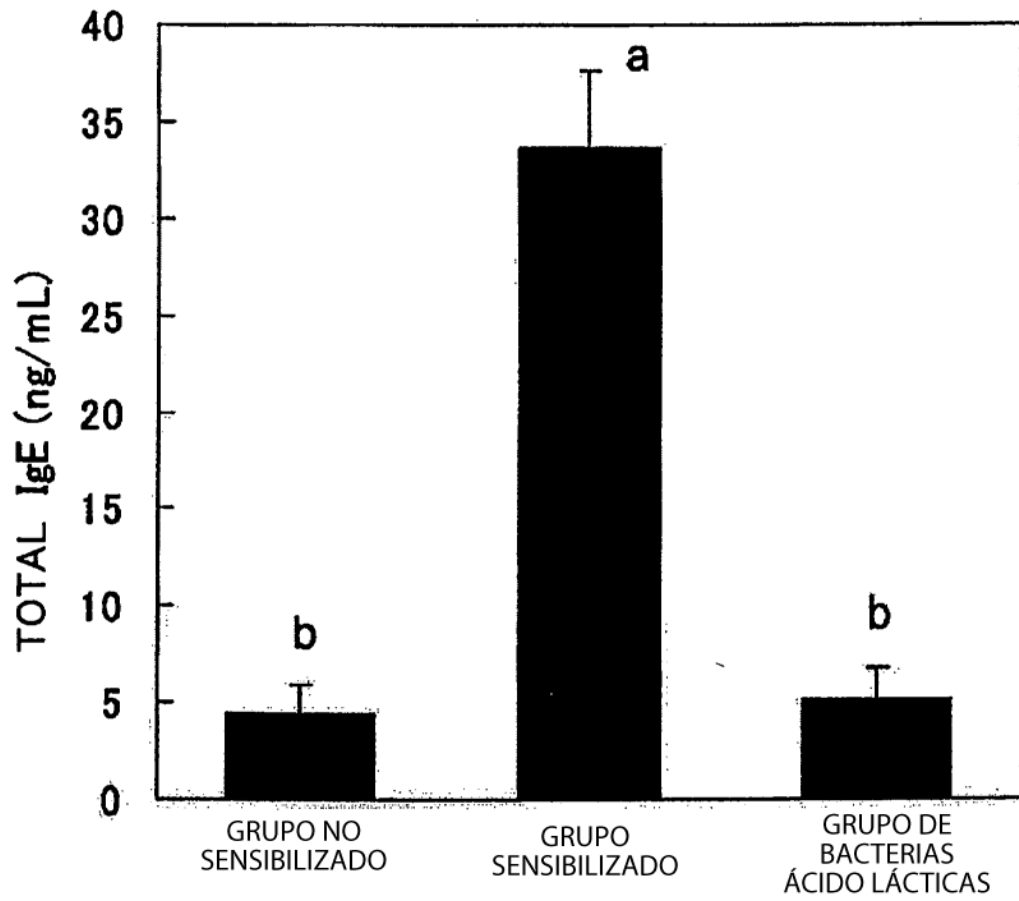




FIG. 5

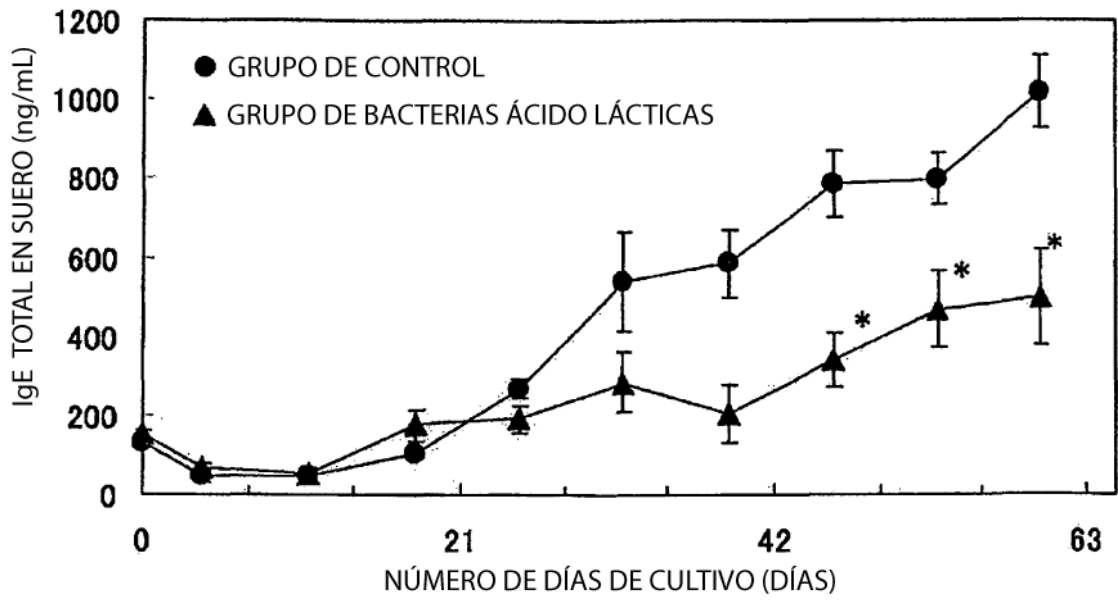


FIG. 6

