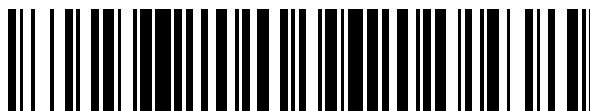


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 502**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 1/30 (2013.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2009 E 09847609 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2457992**

54 Título: **Nueva Lactobacillus plantarum y composición que comprende la misma**

30 Prioridad:

22.07.2009 KR 20090067015

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

12.02.2016

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500, Namdaemunro 5-ga Jung-gu
Seoul 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, BONG JOON;
JUNG, HEON WOONG;
HWANG, SE HEE;
LEE, JIN HEE;
LEE, KANG PYO;
HWANG, KWANG WOO y
WON, TAE JOON**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 559 502 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

Nueva *Lactobacillus plantarum* y composición que comprende la misma

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una nueva *Lactobacillus plantarum* y a composiciones que comprenden la misma. Más particularmente, la presente invención se refiere a una nueva *Lactobacillus plantarum* útil para la prevención/tratamiento de una enfermedad entérica y una enfermedad inmunológica y a una composición que

10 comprende la misma.

Técnica anterior

15 Las bacterias del ácido láctico que se pueden encontrar en los alimentos fermentados tradicionales, tal como 'Kimchi', constituyen una relación simbiótica con el ser humano dentro del tracto digestivo y digieren fibras y proteínas compuestas. Estos microorganismos contribuyen al ambiente digestivo en el ser humano u otros animales y se denominan "probióticos". Estos probióticos deberían tener una buena resistencia al ácido, resistencia a ácidos biliares y adherencia a las células epiteliales intestinales con el fin de fijarse con eficiencia al intestino delgado cuando se toman por vía oral.

20 *Lactobacillus* sp. son bacterias representativas que se encuentran en alimentos fermentados tradicionales tales como 'Kimchi'. *Lactobacillus* sp. son bacterias con forma de bastón que se encuentran dentro del tracto gastrointestinal del ser humano u otros animales, productos lácteos y vegetales, y produce homo o heterofermentación. *Lactobacillus* sp. disminuye el pH de los tractos gastrointestinales para deprimir la reproducción de bacterias dañinas, tales como *E. coli* o *Clostridium*, y mejora la diarrea o el estreñimiento. Asimismo, estas bacterias tienen un papel en la síntesis de vitaminas, actividades anticarcinogénicas y reducen los niveles de colesterol. La acidofilina, que es un producto de la actividad de las bacterias del ácido láctico, también reduce el crecimiento de *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E. coli*. Adicionalmente, las bacterias del ácido láctico mejoran la diarrea, disminuyendo el crecimiento de las bacterias responsables de la diarrea y normalizan la flora intestinal.

25 (Michael y Phillipe, Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea, The journal of nutrition, Volumen 137, March 2007, páginas 803S-811S; Roberfroid, Prebiotics and probiotics: Are the functional foods?, American journal of clinical nutrition, Volumen 71, Junio de 2000, páginas 1682S-1687S).

35 En la actualidad existe una cantidad creciente de investigación sobre el desarrollo de probióticos y alimentos usando las características mencionadas anteriormente de *Lactobacillus* sp. La diarrea causada por bacterias en ganado conduce a la disminución de la tasa de ganancia y el incremento de la tasa de mortalidad. Por tanto, con el fin de evitar esto, generalmente se ha aceptado la adición de antibióticos a los piensos. No obstante, el uso de antibióticos en piensos se está regulando adicionalmente y se recomienda la cría orgánica de ganado debido a los problemas derivados de las bacterias resistentes a antibióticos y los restos de los antibióticos en los animales. (publicación de patente coreana abierta a inspección pública 1998-78358) (McEwen y Fedorka-Cray, Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Disease, Volumen 34, Junio 2002, páginas S93-S106).

45 Adicionalmente se sabe que *Lactobacillus* sp. es eficaz en el incremento de la respuesta inmunitaria. Recientemente, las enfermedades inmunitarias, tales como alergia o enfermedad atópica, están aumentando en todo el mundo, incluida Corea. En la actualidad en Europa se está llevando a cabo bacterioterapia dirigida a curar estas enfermedades mediante la administración oral de bacterias del ácido láctico. La investigación describe que *Lactobacillus rhamnosus* había disminuido la tasa de incidencia de la enfermedad atópica en niños (Kalliomaki et al., Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial, Lancet, Volumen 357, Abril 2001, páginas 1076-1079). Asimismo, se ha comunicado que el área y el grado de eccema había disminuido en niños con progresión de atopia cuando fueron tratados con *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus reuteri* (Rosenfeldt et al., Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis, Dermatologic and ocular diseases, Volumen 111, Febrero de 2003, páginas 389-395).

55 Aunque el mecanismo exacto del incremento del efecto inmunitario de las bacterias del ácido láctico no se ha revelado, la investigación dirigida a entender la causa está actualmente en marcha y, hasta ahora, se entiende que las bacterias del ácido láctico administradas por vía oral habitan en el tracto gastrointestinal e influyen en el sistema inmunológico. Por ejemplo, se ha notificado que las bacterias del ácido láctico de yogures aumenta la actividad de los linfocitos de las placas de Peyer y estimulan la respuesta de IgA mostrada a partir de los experimentos tanto con animales como con seres humanos. Además, las bacterias del ácido láctico afecta al sistema inmunológico tanto innato como adaptativo. Estas bacterias matan las bacterias patogénicas en el tracto gastrointestinal (inmunidad innata) y también activan a los macrófagos que destruyen y presentan el antígeno al linfocito T (inmunidad adaptativa) que produce varias citocinas e interleucinas tales como IL-12 e IL-18. La mayor secreción de citocinas es un resultado de la activación de NF-κB y la vía de señalización de STAT en los macrófagos estimulados por los componentes de la pared celular de las bacterias del ácido láctico. Además, las bacterias del ácido láctico son células presentadoras de antígeno profesionales y activan las células dendríticas en los ganglios linfáticos y las membranas mucosas gastrointestinales, de modo que producen secreción de mayores niveles de IL-12, IL-18 y

65

TNF α . Adicionalmente, estas bacterias también aumentan las proteínas de membrana de las células dendríticas que activan el MHC de clase II y B7-2 que estimula los linfocitos T (Cross et al., Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?, International Immunopharmacology, Volumen 1, Mayo de 2001, páginas 891-901). El documento US2004/047849 A1 divulgó una cepa bacteriana del ácido láctico para estimular la secreción de IFN- γ , donde la cepa se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* CCRC 12944, la cepa de *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079, la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CCRC 10940, la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCRC 14023, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCRC 14007 y la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCRC 14069.

Los linfocitos T son esenciales en la inmunidad adaptativa y están comprendidos en las respuestas Th1 mediada por células y Th2 mediada por anticuerpos. Durante la respuesta Th1, la producción de citocinas por las células presentadoras de antígeno, tales como IL-2, IL-18, e interferón (IFN) es dominante. Pero durante la respuesta Th2 dominan PGE2, IL-4 e IL-10. El equilibrio entre estas dos respuestas es importante y cuando el equilibrio se interrumpe se pueden producir varias enfermedades inmunitarias. Las células Th1 están implicadas principalmente en la infección, donde las células Th2 están asociadas con respuestas alérgicas e inflamatorias. En el caso donde las células Th2 están hiperactivadas, la producción de anticuerpos IgE aumenta y pueden producir respuestas alérgicas a algunas proteínas (polen, alimentos), que no eran tan dañinas antes. El documento EP 1 634 600 A1 divulgó que después de ingerir *Lactobacillus paracasei* KW3110, el equilibrio inmunológico en el cuerpo de los ratones cambió a TH1 y mejoró el estado alérgico. Además, el documento EP 1 880 726 A1 divulgó *Lactobacillus gasseri* OLL2809 y reveló que tenía un fuerte efecto supresor sobre la producción de IgE específica de antígeno a través de una administración intraperitoneal de ovoalbúmina para ratones BALB/c. Por tanto, es importante que las respuestas Th1 y Th2 permanezcan equilibradas, ya que la inestabilidad puede producir enfermedad. Además, se ha notificado que la secreción de cortisol que se produce por estrés continuo puede causar cáncer, atopía, alergia y enfermedades autoinmunitarias, como en este caso, la respuesta Th1 disminuye y la respuesta TH2 aumenta (Elenkov and Chrousos, Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism, Volumen 10, Noviembre 1999, páginas 359-368).

En un experimento *in vivo* se ha notificado que las bacterias del ácido láctico aumentan la secreción de IFN- γ , que es una citocina de las células Th1, pero deprime la secreción de IL-4 e IL-5, que son citocinas de las células Th2 (Matsuzaki et al., The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice, Journal of Dairy Science, Volumen 81, Enero 1998, páginas 48-53). El documento KR 2007/0078107A divulgó que *Lactobacillus plantarum* K8 estimula la producción de la citocina de Th1 IL-12, IL-23, pero suprime la liberación de las citocinas Th2 IL-4, IL-10. Asimismo, otro experimento describió que la administración de bacterias del ácido láctico en ratones sensibilizados con ovoalbúmina que muestra una respuesta de Th2 sesgada a un nivel aumentado de IFN- γ pero menores niveles de IL-4, IL-5 e IgE. Adicionalmente, el cocultivo de las células del bazo obtenidas de estos animales con bacterias del ácido láctico produjo el mismo patrón de producción de citocinas como el experimento *in vivo*. No obstante, el cocultivo de linfocitos T con bacterias del ácido láctico no mostró el incremento de IFN- γ , lo que sugiere que las células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos o células dendríticas, pueden ser necesarias para la producción de IFN- γ de linfocitos T (Kato et al., Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes, International Journal of Immunopharmacology, Volumen 21, Febrero de 1999, páginas 221-131). Se demostró que *Lactobacillus plantarum* L-137 muerto con calor suprimía la producción de IgE contra los alérgenos alimentarios, así como el crecimiento tumoral en ratones, a través de la producción de IL-12, que induce la respuesta inmunitaria de tipo Th1 (Hirose et al., Daily Intake of Heat-Killed *Lactobacillus plantarum* L-137 Augments Acquired Immunity in Healthy Adults, The Journal of Nutrition, Volumen 136, Diciembre 2006, página 3069). Adicionalmente se ha notificado que la secreción de IL-12 e IL-18, que son citocinas producidas de macrófagos o células dendríticas, aumentó de forma dependiente de la dosis cuando estas células se cocultivaron con bacterias del ácido láctico. Se ha notificado que las bacterias del ácido láctico pueden suprimir de forma diferencial la inflamación de las vías respiratorias inducidas por alérgenos a través de la regulación por aumento de citocinas de Th1 y la regulación por disminución de las citocinas de Th2 en células dendríticas *in vivo* y sugiere que *L. plantarum* aislado de Kimchi es un probiótico eficaz para inhibir las enfermedades alérgicas de las vías respiratorias (Hong et. al., Differential suppression of allergen-induced airway inflammation in murine model of asthma by lactic acid bacteria, FASEB Journal, Volumen 22, Abril 2008, página 481). Por tanto, las bacterias del ácido láctico equilibran las respuestas Th1/Th2, en las que la respuesta Th2 es dominante, mediante estimulación la respuesta Th1 y aumento de la producción de IL-12 e IL-18 (Cross et al., Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?, International Immunopharmacology, Volumen 1, Mayo 2001, páginas 891-901). Por tanto, las bacterias del ácido láctico son beneficiosas para prevenir o tratar el cáncer, la atopía, la alergia y las enfermedades autoinmunitarias, causadas por el desequilibrio de las respuestas Th1/Th2 y las respuestas dominantes Th2.

Descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra un gráfico que ilustra la resistencia al ácido de *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

La FIG. 2 muestra un gráfico que ilustra la resistencia al ácido biliar de *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

La FIG. 3 muestra un gráfico que ilustra las propiedades de adherencia a las células epiteliales intestinales de *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

5 La FIG. 4 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 que es una citocina que induce respuesta Th1 de un esplenocito de ratón. Este esplenocito se trató previamente con ovoalbúmina que induce respuesta Th2 y después se cocultivo con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y también con otras bacterias para comparación de la medición de IL-12.

10 La FIG. 5 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-4 que es una citocina que induce respuesta Th2 de un esplenocito de ratón. Este esplenocito se trató previamente con ovoalbúmina que induce respuesta Th2 y después se cocultivo con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y también con otras bacterias para comparación de la medición de IL-4.

15 La FIG. 6 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 e IL-10 usando ELISA de la línea celular de macrófagos RAW264.7 tratada con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

20 La FIG. 7 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 e IL-10 usando ELISA de la línea celular de células dendríticas JAWSII tratada con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

25 La FIG. 8 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de ARNm de IL-12p40 y IL-18 usando RT-PCR de macrófagos RAW264.7 tratados con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

La FIG. 9 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de ARNm de IL-12p40 e IL-18 usando RT-PCR de células dendríticas JAWSII tratadas con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

30 La FIG. 10a muestra el espesor de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

35 La FIG. 10b muestra la fotografía del microscopio óptico e linfocitos acumulados dentro de la lesión inflamatoria de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 11a muestra un gráfico que ilustra el número de eosinófilos de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

40 La FIG. 11b muestra la fotografía de microscopio óptico de la infiltración de eosinófilos en la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 12a muestra un gráfico que ilustra el número de mastocitos de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

45 La FIG. 12b muestra la fotografía de microscopio óptico de la infiltración de mastocitos en la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

50 La FIG. 13a muestra un gráfico que ilustra el número de fibras nerviosas de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 13b muestra la fotografía de microscopio óptico de la infiltración de fibras nerviosas en la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

55 La FIG. 14 muestra la fotografía de microscopio óptico del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

60 La FIG. 15 muestra un gráfico que ilustra el número total de células contadas del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 16 muestra un gráfico que ilustra el número total de linfocitos T contados del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

65 La FIG. 17 muestra un gráfico que ilustra el número total de linfocitos B contados del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido

láctico.

La FIG. 18 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 usando ELISA de una única suspensión de células del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico, después de cultivar con extracto de ácaro del polvo.

La FIG. 19 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IFN- γ usando ELISA de una única suspensión de células del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico, después de cultivar con extracto de ácaro del polvo.

Divulgación

Problema de la técnica

Los inventores separaron e identificaron una nueva cepa de *Lactobacillus* sp de alimentos fermentados tradicionales con el fin de desarrollar una bacteria más eficiente para controlar el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 causada por una respuesta Th2 excesiva, que otras bacterias conocidas.

Por tanto, el objetivo de la invención es desarrollar una nueva cepa de *Lactobacillus* sp. que tiene una excelente resistencia al ácido, resistencia a ácidos biliares, adherencia a las células epiteliales intestinales e inducir una respuesta inmunitaria mejorara, especialmente equilibrando la respuesta Th1/Th2 cuando se produce una respuesta Th2 excesiva.

El otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición compuesta por la nueva cepa mencionada de *Lactobacillus* sp., que es beneficiosa para su uso en un método de tratamiento de enfermedades entéricas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición compuesta por la nueva cepa mencionada de *Lactobacillus* sp. que es beneficiosa para mejorar las respuestas inmunitarias.

Solución de la técnica

Con el fin de conseguir el objetivo mencionado, la presente invención proporciona *Lactobacillus plantarum* CJLP133 (depositada en el Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 2008.10.16, número de depósito: KCTC 11403BP).

Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133, que es beneficiosa para su uso en un método de tratamiento de enfermedades entéricas.

Además, la presente invención proporciona una composición compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133, que es beneficiosa para la mejora de las respuestas inmunitarias. A continuación sigue la descripción detallada de la presente invención.

Lactobacillus plantarum CJLP133 se caracteriza como una nueva cepa de *Lactobacillus plantarum* que se separó e identificó en alimentos fermentados tradicionales. Los alimentos fermentados tradicionales mencionados son kimchi, vegetales fermentados, pasta de soja, salsa de soja, pasta de judías de fermentación rápida y pescado salado, pero no están limitados a estos.

La presente *Lactobacillus plantarum* CJLP133 fue un 99,9 % homóloga con la cepa de referencia (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891¹, número de acceso en GenBank AB326351) que muestra una filogenia altamente molecular conformada mediante secuenciación del ARNr 16S. Por tanto, el microorganismo mencionado se ha identificado como *Lactobacillus plantarum*, denominado *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y se ha depositado en el Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) el 16 de octubre de 2008 (número de depósito KCTC 11403BP). El resultado de la secuenciación del ARNr 16S de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 se ha adjuntado a esta memoria de patente en el listado de secuencias SEC ID N.º 1.

En la presente invención, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 es una bacteria grampositiva que es un anaerobio facultativo capaz de crecer en condiciones aerotrópicas y anaerobias. Esta bacteria tiene forma de bastón y es inmóvil y no forma esporas. Las características morfológicas y fisiológicas detalladas de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 se enumeran en la Tabla 1 de acuerdo con los criterios habituales de este campo técnico.

Tabla 1

Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas	Resultados
Morfología	Bastón
Motilidad	-
Espora	-

ES 2 559 502 T3

Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas	Resultados
Catalasa	-
Fermentación homo-hetero	Fermentación facultativa
Proliferación a 15 °C	+
Proliferación a 45 °C	-
Proliferación al 3 % de NaCl	+
Proliferación anaerobia	+
Producción de CO ₂ con glucosa	-
Características de la fermentación del azúcar	
Glicerol	-
Eritritol	-
D-arabinosa	-
L-arabinosa	-
Ribosa	+
D-xilosa	-
L-xilosa	-
Adonitol	-
Xilósida	-
Galactosa	+
D-glucosa	+
D-fructosa	+
D-manosa	+
L-sorbosa	-
Ramnosa	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Manitol	+
Sorbitol	+
D-manósido	-
D-glucósido	-
Glucosamina	+
Amigdalina	+
Arbutina	-
Esculina	+
Salicina	+
Celobiosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Melibiosa	+
Sacarosa	+
Trehalosa	+
Inulina	-
Melizitosa	+
D-rafinosa	+
Amidón	-
Glucógeno	-
Xilitol	-
Gentiobiosa	+
D-turanosa	-
D-lixosa	-
D-tagatosa	-
D-fucosa	-
L-fucosa	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Gluconato	-
2 Gluconato	-
5-Gluconato	-

+: Reacción positiva
-: Reacción negativa

Con el fin de conservar *Lactobacillus plantarum* CJLP133 durante un periodo largo de forma segura, se recomienda guardar las bacterias en líquido de conservación mezclado con agua y glicerol a -70 °C o en suspensión en leche desgrasada al 10 % esterilizada, seguido de liofilización.

- 5 Adicionalmente, en la presente invención *Lactobacillus plantarum* CJLP133 es probiótico, que es beneficiosa para la limpieza intestinal y mejores respuestas inmunitarias como otras bacterias del ácido láctico.

En la presente invención, “probiótico” es un término entendido como un microorganismo vivo que es beneficioso para mejorar el ambiente gastrointestinal en seres humanos y otros animales, de modo que contribuyen a la salud del huésped. Los probióticos son microorganismos vivos con actividad probiótica y son beneficiosos para la microbiota intestinal cuando se administran a seres humanos o animales como una cepa bacteriana mixta o única en forma seca o fermentada. Con el fin de que sea un microorganismo probiótico eficiente, es importante que en primer lugar estas bacterias sean capaces de atravesar el estómago sin que le afecte el jugo gástrico y la bilis, de modo que las bacterias alcanzan y sobreviven en el intestino para contribuir a la salud de la microbiota intestinal. Por tanto, estas bacterias deben tener resistencia al ácido, resistencia a ácidos biliares y adherencia a las células epiteliales intestinales. En segundo lugar, estas bacterias deberán ser microorganismos seguros y se realizan evaluaciones de seguridad usando el ensayo de licuefacción de gelatina, ensayo de fenilalanina desaminasa, ensayo de amonificación y ensayo de hemólisis. *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en la presente invención tiene una excelente resistencia al ácido, resistencia a ácidos biliares y adherencia a las células epiteliales intestinales. Asimismo, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 mostró un resultado negativo en el ensayo de licuefacción de gelatina, el ensayo de fenilalanina desaminasa y el ensayo de amonificación, y mostró α -hemólisis para el ensayo de hemólisis que demuestra la seguridad.

En la presente invención se predice que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 es beneficioso para la salud intestinal, ya que tiene una excelente resistencia al ácido, resistencia a ácidos biliares y adherencia a las células epiteliales intestinales. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133 que es beneficiosa para la prevención o tratamiento de enfermedades entéricas.

La composición mencionada compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133 que es beneficiosa para su uso en el método de tratamiento de enfermedades entéricas se puede usar en mamíferos, incluidos seres humanos, y, preferentemente, en ganado, tales como vacas, caballos, cerdos. Las “enfermedades entéricas” mencionadas incluyen infección del tracto gastrointestinal y enfermedades entéricas inflamatorias. Por ejemplo, la diarrea infecciosa causada por microorganismos patógenos (*E. coli*, *Salmonella*, *Chlostridium*), gastroenteritis, enfermedades entéricas inflamatorias, colitis neurogénica, sobrecrecimiento de microorganismos en el intestino delgado, gastroenteritis aguda, están incluidas, pero solo limitadas a estas. Se prefiere que el *Lactobacillus plantarum* CJLP133 mencionado usado para la presente composición esté vivo, aunque se puede usar vivo o muerto. En general, las bacterias vivas curan y mejoran cualquier síntoma causado por la fermentación anómala por microorganismos intestinales y evitan que las bacterias dañinas se adhieran a las paredes intestinales cuando se administran a seres humanos o a animales. Asimismo, las bacterias vivas producen lactato, que funciona disminuyendo el pH intestinal, por lo que evitan la supervivencia de las bacterias dañinas. Adicionalmente, las bacterias vivas administradas impiden la proliferación de bacterias dañinas y ayudan en la actividad de las vellosidades intestinales, que absorben nutrientes y producen bacteriocina y peróxido. Además, las bacterias vivas son beneficiosas para producir material que ayude a la absorción de nutrientes y su uso, mejoran la tasa de demanda de los alimentos y neutralizan producir compuestos tóxicos secretados por bacterias patógenas.

Se recomienda que la vía de administración del presente compuesto descrito en la presente invención sea por métodos orales, aunque no está limitado a ellos. La dosis difiere en función del tipo de enfermedad entérica, el grado de los síntomas, la edad, el sexo, la raza, la finalidad de la administración (tratamiento o prevención), no obstante, en general, en los adultos, se pueden administrar de diez millones a 100 billones de bacterias.

Adicionalmente, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 no solo es beneficioso para la salud intestinal sino que acelera las respuestas inmunitarias considerablemente en comparación con otras bacterias del ácido láctico. *Lactobacillus plantarum* CJLP133 aumenta la secreción de IL-12 que induce respuesta Th1 en el bazo, y también suprime la secreción de IL-4 que induce la respuesta Th2. Asimismo, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 estimula las células presentadoras de antígeno que regulan la respuesta inmunitaria de linfocitos T, tales como macrófagos y células dendríticas. Después, estas células presentadoras de antígeno secretan citocinas que inducen la diferenciación de las células Th1 desde células Th0, de forma que se compensa el desequilibrio de Th1/Th2, de modo que se demuestra el hecho de que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 tiene la capacidad de producir regulación inmunitaria. A continuación se explica una descripción más detallada de la respuesta inmunitaria aumentada causada por *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

Lactobacillus plantarum CJLP133 produjo de 7,3 a 9,5 veces más IL-12, que induce la respuesta Th1 y suprimió la producción de IL-4, que induce la respuesta Th2 en de 3,2 a 12,1 % en comparación con los controles negativos. Las citocinas se midieron de esplenocitos de ratón tratados con ovoalbúmina, de forma que la respuesta Th 2 es dominante. El efecto regulador inmunitario de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 es superior a las otras bacterias del ácido láctico, tales como *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC3109), *Lactobacillus*

sakei CJLS118 (KCTC13416). Por tanto, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 posee propiedades reguladoras inmunitarias, ya que equilibra el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 suprimiendo la respuesta Th2 y estimulando la respuesta Th1.

5 Además, se ha confirmado que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 mejora las respuestas inmunitarias estimulando los macrófagos, demostrado mediante experimentos en los que se cocultivan *Lactobacillus plantarum* CJLP133 con macrófagos (RAW264.7) y células dendríticas (JAWSII). Cuando se cocultivó *Lactobacillus plantarum* CJLP133 con macrófagos (RAW264.7) y células dendríticas (JAWSII), la secreción de IL-12 e IL-18, que inducen ambas la diferenciación de células Th1, aumentó, pero la secreción de IL-10, que inhibe la diferenciación de células Th1, se redujo en comparación con IL-12. Este experimento también demuestra que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 posee propiedades reguladoras inmunitarias, ya que equilibra el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 estimulando la respuesta Th1.

15 IL-4 se secreta a partir de células Th2, es esencial para la inmunidad celular y es una citocina antiinflamatoria que suprime la secreción de IL-12 a partir de células Th1. Informes recientes han descrito que la cantidad de células Th2 que secretan IL-4 e IL-5 aumentaba en la sangre y las lesiones cutáneas de pacientes con dermatitis atópica (Miraglia et al., Immune dysregulation in atopic dermatitis, Allergy and Asthma Proceedings, Volumen 27, Noviembre-Diciembre 2006, páginas 451-455). Por tanto, la dominación de la respuesta Th2 y el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 pueden causar enfermedades, tales como dermatitis atópica. Asimismo, como se ha descrito anteriormente, el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 puede producir enfermedad. Se pueden producir enfermedades, tales como cáncer, dermatitis atópica, alergia y enfermedades autoinmunitarias cuando la respuesta Th1 disminuye y la respuesta Th2 aumenta (Elenkov y Chrousos, Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/antiinflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism, Volumen 10, Noviembre 1999, páginas 359-368). Por tanto, se puede usar *Lactobacillus plantarum* CJLP133 para el tratamiento no solo de dermatitis atópica, alergias por sus propiedades reguladoras inmunitarias que equilibran las respuestas Th1/Th2, sino también para el tratamiento de cáncer o enfermedades autoinmunitarias.

30 Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona una composición compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133, que es beneficiosa para incrementar las respuestas inmunitarias. Esta composición es eficaz para aumentar las respuestas inmunitarias debido a la actividad de *Lactobacillus plantarum* CJLP133. Asimismo, esta composición es eficaz para la prevención o el tratamiento de enfermedades causadas por el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 y la respuesta Th2 dominante, debido a la actividad de *Lactobacillus plantarum* CJLP133. Por consiguiente, la presente composición compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133 se puede usar para la prevención o el tratamiento de dermatitis atópica, alergia, cáncer y enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias, tales como asma y fiebre del heno, podrían prevenirse o tratarse, pero no está limitado solo a estas.

40 Se recomienda que la vía de administración de la presente composición compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133 sea por métodos orales, pero no se limita a estos. La dosis difiere en función del tipo de enfermedad entérica, el grado de los síntomas, la edad, el sexo, la raza, la finalidad de la administración (tratamiento o prevención), no obstante, en general, en los adultos, se pueden administrar de diez millones a 100 billones de bacterias.

45 La composición descrita compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133, que es beneficiosa para la prevención o el tratamiento de enfermedades entéricas e incrementar las respuestas inmunitarias, carece de efectos secundarios en su uso como medicamento, alimento funcional saludable, cosméticos, alimentos para animales y aditivos para piensos, e incluye ácido láctico con una seguridad demostrada.

50 En el caso en que la composición descrita compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133 se use como sustancia médica, la composición se puede fabricar en vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables. Esta composición se puede fabricar en una forma farmacéutica oral, preferentemente. Por ejemplo, para la administración se podrían usar la forma líquida, concentrado en suspensión, forma en polvo, forma en gránulos, comprimidos, cápsulas, pastillas o formas en extracto.

55 En la formulación en una forma farmacéutica respectiva, en la fabricación de la forma de osificación se pueden añadir vehículos o aditivos farmacéuticamente aceptables y requeridos. Por ejemplo, en la formulación de las formas farmacéuticas orales se pueden usar al menos un vehículo seleccionado de diluyentes, agentes deslizantes, agentes aglutinantes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes estabilizantes y conservantes; y al menos un aditivo seleccionado de agentes aromatizantes, vitaminas y antioxidantes.

60 Se puede usar cualquier vehículo y aditivo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, puede ser deseable usar como diluyentes lactosa, almidón de maíz, aceite de soja, celulosa microcristalina o manitol; como agentes deslizantes se usa estearato de magnesio o talco; como agentes aglutinantes se usan polivinilpirrolidona o hidroxipropilcelulosa. Adicionalmente, puede ser preferible usar carboximetilcelulosa cálcica, glicolato almidón sódico, poliacrilina potásica o crospovidona como agentes disgregantes; azúcar blanco, fructosa, sorbitol o aspartamo se usan como agentes edulcorantes; carboximetilcelulosa sódica, β -ciclodextrina, cera blanca o goma

xantana se usan como estabilizantes; y p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo o solvato de potasio se usan como agentes conservantes.

5 Adicionalmente, además de los ingredientes anteriores, se pueden usar hierbas naturales con sabor de Mae-sil (albaricoque japonés), sabor de limón, sabor de piña o sabor de hierbas, zumo de frutas natural, pigmentos naturales tales como clorofilina o flavonoide, ingredientes edulcorantes tales como fructosa, miel, alcohol de azúcar o azúcar, acidificantes tales como ácido cítrico o citrato sódico, después de mezclar con la finalidad de abrir el apetito.

10 Los métodos de formulación y vehículos y aditivos necesarios para dicha formulación se detallan en Remington's Pharmaceutical Sciences (19^a ed., 1995).

15 Adicionalmente, la presente composición compuesta por *Lactobacillus plantarum* CJLP133 se puede usar como alimento. La composición alimentaria cubre alimentos generales convencionales de consumo diario, así como alimentos saludables. Si la composición alimentaria se usa en los alimentos saludables, se puede formular en formas de dosificación de alimentos saludables convencionales conocidas en la técnica, con vehículos o aditivos sitológicamente aceptables. Los alimentos saludables pueden formularse en, por ejemplo, forma de polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensión, emulsión, jarabe, líquido, extracto, gelatina o bebida. Como vehículos o aditivos sitológicamente aceptables, se puede usar un vehículo o aditivo arbitrario útil en cualquier forma para la preparación.

20 La presente composición también se puede usar como cosmético, ya que es beneficiosa para la prevención y el tratamiento de la dermatitis atópica. La composición cosmética de acuerdo con la presente invención se puede formular de forma convencional conocida en la industria cosmética. Se puede usar cualquier vehículo o aditivo que sea aceptable y necesario en la fabricación de una forma cosmética específica.

25 La presente composición también se puede usar como aditivos de piensos o alimentos para animales.

30 Usada en los aditivos de piensos, la composición se puede fabricar en una forma de líquido, polvos o gránulos de 20 a 90 % altamente concentrada. El aditivo para piensos puede incluir adicionalmente al menos uno seleccionado de ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido humálico, ácido adípico, ácido láctico y ácido málico; fosfatos tales como fosfato sódico, fosfato potásico, pirofosfatos ácidos y polifosfatos (fosfato condensado); y antioxidantes naturales tales como polifenoles, catequinas, alfa-tocoferoles, extractos de romero, vitamina C, extractos de té verde, extractos de regaliz, quitosano, ácidos tánicos y ácidos fítics. Usada en la composición de piensos, la composición se puede fabricar en forma de un pienso animal convencional e incluir ingredientes para piensos convencionales.

40 Los aditivos para piensos y los piensos animales pueden incluir adicionalmente cultivos, por ejemplo trigo machacado o triturado, avenas, cebada, maíz y arroz; piensos de proteínas vegetales, por ejemplo piensos constituidos principalmente por colza, soja y girasol; piensos de proteínas animales, por ejemplo harina de sangre, harina de carne, harina de huesos y harina de pescado; y azúcar y productos lácteos, por ejemplo varios ingredientes secos que consisten en leche en polvo y suero de trigo en polvo, y además pueden incluir suplementos nutricionales, potenciadores de la digestión y la absorción, estimulantes del crecimiento.

45 Los aditivos para piensos se pueden administrar a los animales de forma individual o en combinación con otros aditivos seleccionados de vehículos comestibles. Adicionalmente, los aditivos para piensos pueden ser aderezos, pueden mezclarse directamente con piensos para animales o pueden administrarse fácilmente a los animales como formas de dosificación oral por separado de los piensos para animales. En caso de que se administren por separado de los piensos para animales, los aditivos para piensos se pueden combinar con vehículos comestibles farmacéuticamente aceptables y prepararse en formulaciones de liberación inmediata o formulaciones de liberación sostenida, bien conocidas en la técnica. Los vehículos comestibles pueden ser sólidos o líquidos, por ejemplo almidón de maíz, lactosa, sacarosa, copos de soja, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo y propilenglicol. En caso de que se usen vehículos sólidos, los aditivos para piensos pueden estar en forma de un comprimido, cápsula, polvo, trocisco o pastilla, o puede ser un aderezo no dispersado. Si se usan vehículos líquidos, los aditivos para piensos pueden tener una forma de cápsulas de gelatina blandas, jarabe, suspensión, emulsión o solución.

60 Los piensos pueden incluir una harina de grano orgánico que contiene proteínas arbitrarias que se ha usado convencionalmente para satisfacer el apetito de los animales. La harina de grano que contiene proteínas normalmente consiste en harina de maíz o de soja o es una mezcla de harina de maíz/soja.

Además, los aditivos para piensos y los piensos para animales pueden contener adyuvantes tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes y agentes de licuefacción. Los aditivos para piensos se pueden añadir a los piensos para animales por medio de inmersión, pulverización o mezcla para su uso.

65 Los piensos para animales o los aditivos para piensos de acuerdo con la presente invención se pueden aplicar a una dieta para varios animales, tales como mamíferos, aves y peces. Los mamíferos pueden ser animales domésticos

(por ejemplo, perros, gatos), así como cerdos, vacas, ovejas, cabras y roedores de laboratorio; aves de corral, tales como pollos, pavos, patos, gansos, faisanes y codornices; y peces tales como truchas, sin limitarse a estas.

Efectos ventajosos

5 Como se ha descrito anteriormente, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 de acuerdo con la presente invención es un probiótico que se caracteriza por resistencia al ácido, resistencia a ácidos biliares, adherencia a las células epiteliales intestinales. Esta bacteria también es beneficiosa para la salud intestinal y equilibra el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2 producida por una respuesta Th2 excesiva mediante la estimulación de la respuesta Th1. Por
10 tanto, la nueva *Lactobacillus plantarum* CJLP133 de acuerdo con la presente invención se puede usar en una composición para el tratamiento de enfermedades entéricas y para incrementar la respuesta inmunitaria y para el tratamiento o prevención de enfermedades causadas por el desequilibrio de la respuesta Th1/Th2.

Mejor modo para la invención

15 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle mediante los ejemplos siguientes. No obstante, la finalidad de estos ejemplos es únicamente ilustrar la presente invención, no limitar el alcance de la invención de ningún modo.

20 Ejemplo 1: Aislamiento e identificación del microorganismo bacteriano *Lactobacillus plantarum* CJLP133

Las bacterias del ácido láctico *Lactobacillus plantarum* CJLP133 se sembraron en medio MRS sólido (Difco, EE.UU.) que contiene 1,5 % de agar y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Las colonias que se confirmó que se habían separado de forma pura se cogieron con un asa y se incubaron con caldo MRS (Difco, EE.UU.) a 30 °C durante de
25 18 a 24 horas.

Después, se determinaron la morfología y las propiedades fisiológicas de las bacterias *Lactobacillus plantarum* CJLP133 con los kits API50CH y API50CHL (BioMerieux) de acuerdo con los métodos divulgados en Kim et. al., *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi, International Journal of Systematic and
30 Evolutional Microbiology, Volumen 53, Julio 2003, páginas 1123-1126. La morfología resultante y las propiedades fisiológicas de las bacterias *Lactobacillus plantarum* CJLP133 se resumieron en la tabla 1 anterior.

Adicionalmente, se analizó una secuencia del gen de ARNr 16S para la identificación y clasificación de las bacterias del ácido láctico. La secuencia del gen de ARNr 16S se determinó y analizó de acuerdo con un método divulgado en
35 et. al., *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology, Volumen 50, Septiembre de 2000, páginas 1915-1919. El resultado de la secuenciación de CJLP133 se enumera en el listado de secuencias SEC ID N.º 1.

Dado que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 de acuerdo con la presente invención tiene la homología más alta (99,9 %)
40 %) con la bacteria de referencia *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891^T (número de acceso en GenBank AB326351), *Lactobacillus plantarum* CJLP133 de acuerdo con la presente invención se identificó como *Lactobacillus plantarum*, denominado *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y se depositó en el Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 16 de octubre de 2008 (número de acceso: KCTC 11403BP).

45 Ejemplo 2: Experimento de investigación de la resistencia al ácido y la resistencia a ácidos biliares de *Lactobacillus plantarum* CTLP133 usando jugo gástrico artificial y bilis artificial.

El experimento de resistencia al ácido se realizó usando el jugo gástrico artificial modificado y se efectuó en referencia a un experimento de Kobayashi et al (Kobayashi et al., Studies on biological characteristics of
50 *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. Japan Journal of Microbiology, Volumen 29, Julio 1974, páginas 691-697). Con detalle, el jugo gástrico artificial se fabricó ajustando el pH del medio MRS líquido a un pH 2,5 usando HCl 1N y añadiendo 100 unidades/ml de pepsina, seguido de esterilización.

55 El *Lactobacillus plantarum* CJLP133 aislado como se describe en el ejemplo 1 se cultivó en medio MRS líquido a 37 °C durante 18 horas y después se centrifugó para precipitar. Después, la precipitación se lavó con NaCl al 0,85 % esterilizado dos veces. Después se inocularon 10⁷ ufc/ml de la suspensión bacteriana en el medio control y el jugo gástrico artificial para el cultivo adicional a 37 °C. El número total de bacterias vivas se estimó a las 0 y 3 horas de la inoculación después de diluir las bacterias diez veces en tampón fosfato, incluyendo KH₂PO₄, Na₂HPO₄, L-cisteína,
60 HCl, Tween 80.

El experimento de resistencia a ácidos biliares se realizó usando la bilis artificial modificada y se fabricó con referencia a un experimento de Casey et al (Casey et al., Isolation and characterisation of anti-Salmonella lactic acid
65 bacteria from the porcine gastrointestinal tract, Letters in Applied Microbiology, Volumen 39, 2004, páginas 431-438). Las bacterias se cultivaron en el medio MRS líquido al que se había añadido 0,3 % de bilis de toro y se contó el número total de bacterias 0,12 y 24 horas después de la inoculación de las bacterias del ácido láctico igual que en el

experimento de resistencia a ácido.

La resistencia a ácido y la resistencia a ácidos biliares también se analizaron en otras bacterias del ácido láctico representativas, tales como *Lactobacillus casei* (KCTC31.09), *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), para comparar.

Los resultados se ilustran en la FIG. 1 y la FIG. 2. La FIG. 1 muestra un gráfico que ilustra la resistencia a ácido de *Lactobacillus plantarum* CJLP133. La FIG. 2 muestra un gráfico que ilustra la resistencia al ácido biliar de *Lactobacillus plantarum* CJLP133.

De acuerdo con los resultados ilustrados en la FIG. 1 y la FIG. 2, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 mostró más resistencia a ácido y resistencia a ácidos biliares en comparación con otras bacterias del ácido láctico. Esto muestra que las nuevas bacterias descritas en la presente invención son capaces de llegar al intestino y sobrevivir sin que les afecte el jugo gástrico o la bilis en el intestino.

Ejemplo 3: Experimentos que analizan la adherencia epitelial intestinal de *Lactobacillus plantarum* CJLP133

El Korean Cell Line Bank (KCLB) proporcionó la línea celular animal HT-29 con el fin de probar la adherencia epitelial intestinal y se usaron los métodos descritos en la investigación de Kim et al y Hirano et al (Kim et al., Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract, Applied Microbiology and Biotechnology, Volumen 74, Abril 2007, páginas 1103-1111, Hirano et al., The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro, Microbiology and Immunology, Volumen 47, 2003, páginas 405-109).

HT-29 se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco, EE.UU.) al que se le había añadido suero bovino fetal al 10 % desactivado con calor, 1 % de L-Glutamina, penicilina G (100 UI/ml) y estreptomycin (100 mg/ml) a 5 % de CO₂, a 37 °C. Con el fin de analizar la adherencia y el desprendimiento, se sembraron 1,0 x 10⁵ células/ml de las células HT-29 en los pocillos de una placa de 24 pocillos. El medio se intercambiaba cada dos días para el cultivo de estas células hasta que sedimentó una monocapa completa. Las monocapas completas de HT-29 se lavaron 5 veces a 25 °C con tampón PBS y se añadió medio RPMI 1640 sin antibióticos.

Se suspendieron 1,0 x 10⁹ ufc/ml de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en RPMI y se inocularon en cada pocillo que se va a cultivar durante 2 horas a 5 % de CO₂, a 37 °C. Después del cultivo, se lavaron los pocillos con tampón PBS tres veces mediante agitación de la placa a 200 rpm durante 3 minutos, con el fin de eliminar todas las bacterias del ácido láctico en desprendimiento y de analizar las propiedades de adherencia. Después de lavar se añadió tripsina-EDTA al 0,2 % para desprender todas las células de los pocillos. El número de bacterias que se sembró en las placas en placa de agar-MRS se contó usando el método de dilución en serie con peptona después de cultivar a 37 °C durante 24 horas.

Asimismo, con el fin de analizar las propiedades de adherencia parcial de las bacterias del ácido láctico, la misma cantidad de las bacterias del ácido láctico usadas en el experimento anterior se colocó encima de las células HT-29 que se cultivaron en un cubreobjetos de vidrio esterilizado con alcohol al 70 % durante un día en una placa petri. El número de bacterias del ácido láctico que se adhirieron a las células HT-29 se contó al microscopio óptico después de secar y tefir mediante tinción de Gram. Se realizaron experimentos de comparación usando *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033).

Los resultados se ilustran en la FIG. 3. La FIG. 3 muestra un gráfico que ilustra las propiedades de adherencia a las células epiteliales intestinales de *Lactobacillus plantarum* CJLP133. Los resultados ilustrados en la FIG. 3 muestran que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 tiene una adherencia epitelial intestinal medida tras 24 horas mejor que otros probióticos tales como *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) y *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416). Especialmente, las propiedades de adherencia de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 fueron mucho mejores que las de *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416). Estos resultados sugieren que la nueva cepa bacteriana indicada en la presente invención podría mejorar la salud intestinal mediante adherencia al epitelio intestinal.

Ejemplo 4: Evaluación de la seguridad *Lactobacillus plantarum* CILP133

Se realizaron un ensayo de hemólisis, un ensayo de licuefacción de gelatina, un ensayo de metabolito peligroso (amonificación) y un ensayo de fenilalanina desaminasa de acuerdo con los métodos de la evaluación de seguridad sugeridos por el patrón de la Korea Biotechnology Industry Organization para evaluar la seguridad de las bacterias aisladas del ejemplo 1. El resultado obtenido se resume en la tabla 2.

Tabla 2

Evaluación de la seguridad <i>Lactobacillus plantarum</i> CILP133				
Bacteria	Ensayos			
	Licuefacción de gelatina	Fenilalanina desaminasa	Hemólisis	Amonificación
CJLP133	Negativo	Negativo	a-hemólisis, seguro	Negativo

En función del resultado anterior, se encontró que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 era negativo en el ensayo de licuefacción de gelatina, el ensayo de metabolito peligroso (amonificación), el ensayo de fenilalanina desaminasa. El ensayo de hemólisis mostró α -hemólisis, que es irrelevante con las bacterias patógenas. De acuerdo con lo anterior, se confirmó que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 era seguro para administrar a un ser humano.

Ejemplo 5: Evaluación de las propiedades de estimulación de la producción de IL-12 después de tratar esplenocitos de ratón

Se añadió *Lactobacillus plantarum* CJLP133 a esplenocitos de ratón tratados con ovoalbúmina sesgados hacia una respuesta Th2, con el fin de evaluar las propiedades estimulantes de *Lactobacillus plantarum* CJLP133 que inducen la producción de IL-12 que es una citocina inductora de la respuesta Th1. Para el experimento, los métodos procedían de informes de Fujiwara et al. (Fujiwara et al., A double-blinded trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in patients with pollen allergy, *Allergology International*, 2005, volumen 54, páginas 143-149) y Fujiwara et al. (Fujiwara et al., The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance, *International Archives of Allergy and Immunology*, 2004, Volumen135, páginas 205-215).

Se inmunizó a ratones Balb/c hembra de 5 o 6 semanas de edad con una solución mixta compuesta por 1,538 ml de 13 mg/ml de hidróxido de alúmina (Sigma), 10 mg de ovoalbúmina, 0,4615 ml de PBS. Esta solución se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos para la reacción y se inyectaron 0,2 ml (1 mg de OVA + 2 mg de alúmina) por vía peritoneal en el ratón. El día 6 después de la inyección se inyectó en estos ratones la misma cantidad de solución como refuerzo. A los 13 días de la inyección se sacrificó a los ratones para extraer el bazo. Se añadieron 200 μ l (4 x 10⁶ células/ml) de los esplenocitos obtenidos del bazo, 50 μ l de bacterias muertas para análisis y 50 μ l (4 mg/ml) de ovoalbúmina y se colocaron en una placa de cultivo celular en medio DMEM-10 durante 7 días a 10 % de CO₂ para cultivo. Después de 7 días de cultivo, se tomó el fluido del sobrenadante para medir las concentraciones de IL-12 usando el kit de ELISA para IL-12 (Biosource).

Las bacterias muertas para el análisis descrito anteriormente se obtuvieron como se indica a continuación.

Las bacterias de ensayo se inocularon en medio MRS líquido (Difco) y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C. Después, el medio de cultivo se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto, seguido de 2 veces de lavado usando solución salina fisiológica, y se obtuvieron las bacterias. Las bacterias obtenidas se calentaron a 100 °C durante 10 minutos suspendidas en agua destilada esterilizada (la misma cantidad que el medio de cultivo original). Después, la suspensión se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y las bacterias se resuspendieron en medio DMEM a la concentración de 50 μ g/ml y 5 μ g/ml. La bacteria de ensayo fue *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y se realizó el mismo experimento usando *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC 3109) y *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) para comparar.

El ensayo de IL-12 mencionado se realizó usando el kit de ELISA con IL-12 y las instrucciones proporcionadas. Se midió el valor de la DO de la muestra control proporcionada con el kit y en referencia a la ecuación se calculó la cantidad de IL-12 de las muestras. Los resultados se ilustran en la FIG. 4.

La FIG. 4 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 que es una citocina que induce respuesta Th1 de un esplenocito de ratón. Este esplenocito se trató previamente con ovoalbúmina que induce respuesta Th2 y después se cocultivo con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y también con otras bacterias para comparación de la medición de IL-12.

De acuerdo con el resultado mostrado en la FIG. 4, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 induce marcadamente la producción de IL-12, que es una citocina inductora de respuesta Th1, en comparación con otras bacterias. Por tanto, se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en la presente invención induce con eficiencia una respuesta Th1 en ratones con una respuesta Th2 sesgada.

Ejemplo 6: Evaluación de la supresión de la producción de IL-4 tras el tratamiento con esplenocitos de ratón

Con el fin de analizar si *Lactobacillus plantarum* CJLP133 suprime la producción de IL-4 que es una citocina inductora de respuesta Th2, se añadió *Lactobacillus plantarum* CJLP133 a los esplenocitos de ratón sesgados a una respuesta Th2 debido al tratamiento con ovoalbúmina. El kit de ELISA se usó como se ha descrito en el ejemplo 5, pero se usó el kit de IL-4 (Biosource) en lugar del kit de IL-12. Otras condiciones experimentales fueron las mismas y

los resultados se muestran en la FIG. 5.

La FIG. 5 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-4 que es una citocina que induce respuesta Th2 de un esplenocito de ratón. Este esplenocito se trató previamente con ovoalbúmina que induce respuesta Th2 y después se cocultivo con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y también con otras bacterias para comparación de la medición de IL-4.

La FIG. 5 muestra que *Lactobacillus plantarum* CJLP133 suprime la producción de IL-4, una citocina que induce respuesta Th2, de modo que suprime la respuesta Th2 en esplenocitos de ratón sesgados a una respuesta Th2.

Ejemplo 7: Experimentos que analizan la expresión de las citocinas IL-12p40 e IL-18 que inducen la diferenciación en linfocitos Th1 y la expresión de la citocina IL-10 que suprime la diferenciación en linfocitos Th1

Las células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos y células dendríticas, producen IL-12 e IL-18, que inducen la diferenciación de las células Th1 a partir de las células Th0 y, por otro lado, producen IL-10, que suprime la diferenciación de las células Th1 a partir de las células Th0. Se realizaron otros experimentos con el fin de investigar el efecto de las bacterias del ácido láctico sobre la producción de IL-12, IL-10 e IL-18 por los macrófagos y las células dendríticas.

Se añadieron 5×10^7 /ml de bacterias ensayo a la línea de células macrófagos RAW264.7 y se cultivaron durante 48 horas a 37 °C, 10 % de CO₂. Después, se extrajo el medio para medir las concentraciones de IL-12p40 e IL-10 usando el método de ELISA. Asimismo, las bacterias se añadieron a la línea de células dendríticas JAWSII usando el mismo método que antes y las concentraciones de IL-12p40 e IL-10 se midieron usando ELISA.

La bacteria de ensayo fue *Lactobacillus plantarum* CJLP133 y como control positivo se usó lipopolisacárido. *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), *Lactobacillus casei* (KCTC 3109) y *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC 13416) también se usaron en el experimento para comparar los resultados.

La medición de las concentraciones de citocinas se realizó usando el método de ELISA. Se usó el kit de IL-12p40 (BD BioSciences, USA) y el kit de IL-10 (BD BioSciences, USA) para la medición de IL-12 e IL-10 respectivamente. Los resultados se ilustran en la FIG. 6 y la FIG. 7.

La FIG. 6 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 e IL-10 usando ELISA de la línea celular de macrófagos RAW264.7 tratada con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

La FIG. 7 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 e IL-10 usando ELISA de la línea celular de células dendríticas JAWSII tratada con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

De acuerdo con los resultados ilustrados en la FIG. 6 y la FIG. 7, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 produce IL-12, que es una citocina que induce la diferenciación en Th1, y produce menos IL-10, que es una citocina que suprime la diferenciación en Th1, en comparación con IL-12. Asimismo, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 produce una cantidad más considerable de IL-12 que otras bacterias del ácido láctico.

Adicionalmente, con el fin de investigar la cantidad de IL-12 e IL-18 a nivel genético, se añadieron 5×10^7 /ml de las bacterias de ensayo a la línea de células macrófagos RAW264.7 para cultivar a 37 °C, 10 % de CO₂ durante 6 horas. Después, se extrajo el ARN total y la concentración de ARNm de IL-12 e IL-18 se midió usando RT-PCR. También se inocularon bacterias de ensayo y se cultivaron con la línea de células centrífugas JAWSII con el fin de medir la cantidad de ARNm de IL-12 e IL-18 usando RT-PCR.

Los resultados se ilustran en la FIG. 8 y la FIG. 9.

La FIG. 8 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de ARNm de IL-12p40 e IL-18 usando RT-PCR de macrófagos RAW264.7 tratados con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

La FIG. 9 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de ARNm de IL-12p40 e IL-18 usando RT-PCR de células dendríticas JAWSII tratadas con *Lactobacillus plantarum* CJLP133 en comparación con otros tipos de bacterias del ácido láctico.

De acuerdo con los resultados ilustrados en la FIG. 8 y la FIG. 9, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 estimula la producción de ARNm que induce la formación de IL-12 e IL-18, que son citocinas que inducen la diferenciación en células Th1. En particular, *Lactobacillus plantarum* CJLP133 produce una cantidad más considerable del ARNm de IL-12 en comparación con otras bacterias del ácido láctico.

Ejemplo 8: Experimento *in vivo* del efecto de la cepa de *Lactobacillus plantarum* CTLP133 sobre la dermatitis atópica

1) Cría y agrupamiento experimental de animales

5 La cepa de bacterias del ácido láctico se administró por vía oral en ratones NC/Nga enjaulados durante una semana después de llegar a la unidad animal a las 4 semanas de vida. La temperatura se mantuvo a 24 ± 2 °C, y el ciclo de luz fue de 12 horas. El alimento para animales estaba en forma de polvo sin ningún antibiótico añadido. Las bacterias del ácido láctico se administraron por vía oral a los ratones mezclándolas con los alimentos para animales de forma uniforme durante 10 semanas 1×10^{10} ufc/animal). Se indujo dermatitis atópica en animales de 6 semanas de edad tras la administración de bacterias del ácido láctico, aplicando pomada Biostir AD (Biostir, Japón) durante 5 semanas. Los ratones se agruparon en un grupo de no inducción sin inducción de dermatitis atópica, un grupo control al que se indujo dermatitis atópica, un grupo con dermatitis atópica al que se administró bacterias del ácido láctico. Se usaron 8 ratones por cada grupo (Tabla 3). Se usaron *Lactobacillus sakei* CJLS118 (KCTC13416), *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) como bacterias del ácido láctico de ensayo. Asimismo, se usaron CJLP55 (KCTC11401BP), CJLP56 (KCTC 11402BP) y CJLP136 (KCTC 11404BP) desarrollados por el solicitante de la presente invención. Por último, también se usó CJLP133 (KCTC 11403BP) de la presente invención.

Tabla 3

Grupo	Bacterias del ácido láctico administradas	Inducción de dermatitis atópica
Sin inducción		X
Grupo control		O
GG	GG (KCTC 5033)	O
LP55	CJLP55 (KCTC 11401BP)	O
LP56	CJLP56 (KCTC 11402BP)	O
LP133	CJLP133 (KCTC 11403BP)	O
LP136	CJLP136 (KCTC 11404BP)	O
LS118	CJLS118 (KCTC 13416)	O
LA12	CJLA12	O

2) Inducción de dermatitis atópica

25 Se retiró el pelaje del dorso hasta la parte posterior de la oreja de ratones NC/Nga usando una depiladora y todo el pelaje restante se retiró usando una crema depiladora. Se pulverizó una solución de SDS al 4 % sobre el área de aplicación para eliminar el componente lipídico y se secó durante una hora. Se usó una barra plana para aplicar 100 mg de pomada Biostir AD (Biostir, Japón) en el dorso y el lóbulo de la oreja de forma uniforme. La pomada Biostir AD se aplicó 10 veces en total aplicándola dos veces a la semana durante 5 semanas.

3) Tinción del tejido

30 La dermatitis atópica se caracteriza por un engrosamiento de la piel, penetración en el tejido de células inmunitarias, tales como linfocitos, monocitos, eosinófilos, mastocitos, que causan inflamación. Asimismo, las fibras nerviosas se extienden de forma anormal a la epidermis y producen picor. Por tanto, la piel del ratón con dermatitis atópica se retiró para examinar y contar el número de las células inmunitarias y las fibras nerviosas mencionadas anteriormente.

40 Cinco semanas después de inducir dermatitis atópica, se sacrificó a los ratones para extraer la piel. La piel se fijó con solución de fijación sin formalina Accustain y se bloqueó con parafina. El bloque se cortó en $5 \mu\text{m}$ y se sometió a tinción con hematoxilina/eosina para comprobar el grosor de la piel (epidermis + dermis). El tejido también se usó para investigar la acumulación de linfocitos en la lesión inflamatoria usando el microscopio óptico del área de 2×2 mm. Asimismo, el tejido se tiñó con azul de toluidina para detectar mastocitos y con rojo Congo para detectar eosinófilos en el área de 2×2 mm usando el microscopio óptico. Los mastocitos y los eosinófilos se contaron mirando el área desde la epidermis al tejido muscular. Se usó inmunohistoquímica con el fin de detectar la penetración de las fibras nerviosas en el tejido cutáneo. Se usó anticuerpo anti producto génico de la proteína (PGP9.5) para detección y anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con biotina y se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa secuencialmente para la formación de color mediante reacción con peroxidasa.

Los resultados se ilustran en la FIG. 10 y la FIG. 13.

50 La FIG. 10a muestra el espesor de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 10b muestra la fotografía del microscopio óptico e linfocitos acumulados dentro de la lesión inflamatoria de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 11a muestra un gráfico que ilustra el número de eosinófilos de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

5 La FIG. 11b muestra la fotografía de microscopio óptico de la infiltración de eosinófilos en la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 12a muestra un gráfico que ilustra el número de mastocitos de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

10 La FIG. 12b muestra la fotografía de microscopio óptico de la infiltración de mastocitos en la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 13a muestra un gráfico que ilustra el número de fibras nerviosas de la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

15 La FIG. 13b muestra la fotografía de microscopio óptico de la infiltración de fibras nerviosas en la piel retirada del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

20 De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, el grosor de la piel en cada grupo experimental compuesto por los ratones NC/Nga a los que se indujo dermatitis atópica fue de aproximadamente 100 µm. No obstante, el grosor de la piel en ratones a los que se ha administrado CJLP133 fue de aproximadamente 50 pm, que era casi la mitad en comparación con otros (FIG. 10a). Asimismo, durante la observación de la penetración de linfocitos y monocitos, se descubrió que en el grupo al que se administró CJLP133 había un número marcadamente inferior de células inmunitarias, mientras que se tiñeron de color morado más células inmunitarias n el grupo control y en el grupo GG (FIG. 10b).

30 La investigación de eosinófilos y mastocitos en la lesión inflamatoria mostró que el grupo al que se indujo dermatitis atópica tenían un número mayor de eosinófilos y mastocitos en comparación con el grupo de no inducción. No obstante, el grupo que recibió CJLP133 tenía considerablemente menos eosinófilos y mastocitos en comparación con el grupo control y los grupos que reciben otras bacterias del ácido láctico (FIG. 11a y FIG. 12a). Las fotografías del microscopio óptico mostraron que había más eosinófilos y mastocitos de color azul en el grupo control y en el grupo al que se administró GG. No obstante, también se muestra que había menos eosinófilos y mastocitos en el grupo al que se administró CJLP133 (FIG. 11b y FIG. 12b).

35 El análisis inmunohistoquímico mostró que no se observó penetración de fibras nerviosas en el grupo de no inducción. No obstante, en el grupo control se encontraron muchas fibras nerviosas marrones (FIG. 13a). En los grupos a los que se administraron bacterias del ácido láctico, disminuyó el número de fibras nerviosas penetrantes y, especialmente disminuyó un número marcado de fibras nerviosas en los grupos a los que se administró CJLP55, CJLP133, CJLP136 (FIG. 13b).

40 4) Investigación de la composición del ganglio linfático axilar y los esplenocitos

El ganglio linfático axilar (GLA) es un importante órgano inmunológico que desempeña un papel importante en el modelo animal de dermatitis atópica crónica. Existen informes de algunos pacientes con dermatitis atópica crónica grave de que aumenta el tamaño del ganglio linfático axilar. En el ratón NC/Nga, que es un modelo animal de dermatitis atópica inducida por ácaros del polvo, el ganglio linfático axilar he sido el ganglio linfático diana para investigar en muchas investigaciones. Por tanto, en el presente estudio, el ganglio linfático axilar y el bazo, que es el principal órgano inmunológico, se extrajo con el fin de observar el cambio de tamaño y la composición de las células.

50 Cinco semanas después de la inducción de dermatitis atópica se sacrificó al ratón para extraer el ganglio linfático axilar y el bazo para comparar el tamaño. Después, se extrajeron los glóbulos rojos de estos órganos para obtener una única suspensión celular. 1×10^6 células en suspensión se distribuyeron en cada tubo para FACS y se tiñeron con anti-Thy1.2-FITC, anti-CD19-FITC, anti-F4/80-FITC, anti-CD11c-FITC para análisis FACS con el fin de estudiar la composición de los linfocitos T y B. Los resultados se muestran en la FIG. 14 y la FIG. 17.

55 La FIG. 14 muestra la fotografía de microscopio óptico del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

60 La FIG. 15 muestra un gráfico que ilustra el número total de células contadas del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

La FIG. 16 muestra un gráfico que ilustra el número total de linfocitos T contados del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

65 La FIG. 17 muestra un gráfico que ilustra el número total de linfocitos B contados del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico.

De acuerdo con los resultados anteriores, el tamaño del ganglio linfático axilar había aumentado en el grupo control al que se indujo dermatitis atópica y el tamaño fue similar en el grupo al que se administró GG. No obstante, el tamaño del ganglio linfático axilar del grupo al que se administró CJLP55, CJLP56, CJLP133, CJLP136, CJLS118 fue más pequeño que el del grupo control (FIG. 14A). El bazo no mostró demasiada diferencia en tamaño en comparación con los grupos (FIG. 14B). El número de células aisladas del ganglio linfático axilar fue 4,5 veces mayor en el grupo control en comparación con el grupo de no inducción. No obstante, el número de células fue significativamente menor en el grupo al que se administró CJLP55, CJLP133, CJLP136 en comparación con el grupo control (FIG. 15A). El número de células en el bazo no mostró mucha diferencia entre los diferentes grupos (FIG. 15B).

La investigación de los linfocitos T y B se realizó en el ganglio linfático axilar y el bazo mediante tinción y análisis FACS. El número linfocitos T y B del ganglio linfático axilar aumentó cinco veces en el grupo control al que se indujo dermatitis atópica. No obstante, el número de células en todos los grupos a los que se administró CJLP55, CJLP56, CJLP133, CJLP136 disminuyó significativamente en comparación con el grupo control. Especialmente, el número de células disminuyó considerablemente en el grupo de CJLP133 en comparación con otros grupos a los que se administró ácido láctico (FIG. 16a y FIG. 17a). El número linfocitos T y B no mostró mucha diferencia (FIG. 16b y FIG. 17b).

5) Capacidad de producir citocinas de las células del ganglio linfático axilar y los esplenocitos

La IL-12, que se produce principalmente en los macrófagos, induce la diferenciación de los linfocitos Th0 en linfocitos Th1. IFN- γ , producido por los linfocitos Th1, no solo activa los macrófagos sino que también suprime la diferenciación en células Th2 y su actividad. Por tanto, se midieron los cambios en las concentraciones de IL-12 e IFN- γ producidos.

La única suspensión celular se obtuvo del experimento mencionado anteriormente 4) investigación de la composición del ganglio linfático axilar y esplenocitos La suspensión se añadió a cada uno de los pocillos de la placa de 24 pocillos a una concentración de 5×10^6 células por palca y también se añadieron 10 $\mu\text{g/ml}$ del ácaro del polvo (Dermatophagoides farinae body, Dfb). La placa se mantuvo a 37 °C durante 48 horas y, después, se midieron las concentraciones de IFN- γ e IL-12 usando ELISA. Los resultados se ilustran en la FIG. 18 y la FIG. 19.

La FIG. 18 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IL-12 usando ELISA de una única suspensión de células del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico, después de cultivar con extracto de ácaro del polvo.

La FIG. 19 muestra un gráfico que ilustra las concentraciones de IFN- γ usando ELISA de una única suspensión de células del ganglio linfático axilar (A) y del bazo (B) la infiltración extraídos del ratón NC/Nga con dermatitis atópica que se trató con bacterias del ácido láctico, después de cultivar con extracto de ácaro del polvo.

De acuerdo con los resultados, las concentraciones de IL-12 (FIG. 18) e IFN- γ (FIG. 19) aumentaron considerablemente en el grupo que recibió CJLP133 en comparación con el grupo control. Asimismo, la concentración de estas citocinas fue considerablemente mayor en comparación con otros grupos a los que se administraron otras bacterias del ácido láctico conocidas.

Todos los grupos a los que se administró CJLP55, CJLP56, CJLP133, CJLP136 mostraron una mejora de los síntomas de dermatitis atópica y los resultados del experimento 1) 1 5) se resumieron como se ha descrito anteriormente. Especialmente, CJLP133 fue incluso más eficaz para la dermatitis atópica en comparación con otras bacterias del ácido láctico conocidas, avalado por sus efectos celulares y moleculares en los animales, tales como el tamaño del ganglio linfático axilar, el número de células en el ganglio linfático axilar, la penetración de las células inmunitarias o las células nerviosas en las lesiones cutáneas inflamatorias y el equilibrio de las citocinas Th1/Th2.

Ejemplo 9: Fabricación de probióticos que incluyen *Lactobacillus plantarum* CJLP133

Lactobacillus plantarum CJLP133 identificado como se describe en el ejemplo 1 se produjo en masa y se liofilizó para su fabricación en probióticos con el fin de usarlo como medicina, alimento, alimento para animales, aditivos para piensos o material para cosméticos.

Para la producción en masa, las bacterias se cultivaron en medio MRS líquido (Difco) al que se añadió 25 % de NaOH para alcanzar un pH de 6,0 durante 18 horas a 37 °C. Después, las bacterias se obtuvieron mediante centrifugación. A continuación, las bacterias se congelaron a -40 °C usando 5 % de dextrina y 10 % de leche desgrasada como protector, y las bacterias desecadas se molieron usando un mezclador para llegar a una forma en polvo. Las bacterias en polvo se almacenaron y envasaron en una bolsa de aluminio mezcladas con una cantidad adecuada de agente diluyente, tal como glucosa, lactosa, leche desgrasada.

Los probióticos fabricados se pueden usar como probióticos para piensos mezclando con material de piensos, tal como grano en polvo; como medicamento o alimentos saludables en forma de comprimidos o cápsulas mezcladas

ES 2 559 502 T3

con vehículos o aditivos; como cosméticos después de mezclarlos con otro material cosmético. Los probióticos podrían usarse en varias industrias, tal como medicina, alimentaria, alimentos para animales, cosméticos, de acuerdo con los métodos convencionales en la técnica.

- 5 <110> CJ Cheiljedang Corporation
<120> Nueva *Lactobacillus plantarum* y composición que comprende la misma
<130> pn084437
- 10 <160> 1
<170> KopatentIn 1.71
- 15 <210> 1
<211> 1486
<212> ADN
<213> *Lactobacillus plantarum*
- 20 <400> 1

ES 2 559 502 T3

agtcgaacga actctggtat tgattggtgc ttgcatcatg atttacattt gagtgagtgg	60
cgaactggtg agtaaacacgt gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca	120
gatgctaata ccgcataaca acttgaccg catggtccga gtttgaaaga tggcttcggc	180
tatcactttt ggatggtccc gcggcgtatt agctagatgg tgaggtaacg gctcaccatg	240
gcaatgatac gtageccgacc tgagagggtg atcggccaca ttgggactga gacaeggccc	300
aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc	360
aacgccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctggtgtaa agaagaacat	420
atctgagagt aactgttcag gtattgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg	480
tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttgc cggatttatt gggcgtaaag	540
cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc ggctcaaccg aagaagtgca	600
tcggaaactg ggaaacttga gtgcagaaga ggacagtgga actccatgtg tagcggtgaa	660
atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggtct gtaactgacg	720
ctgaggctcg aaagtatggg tagcaaacag gattagatac cctggtagtc cataccgtaa	780
acgatgaatg ctaagtgttg gagggtttc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag	840
cattccgcct ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc	900
acaagcggtg gagcatgttg ttttaattcga agctacgcga agaaccttac caggtcttga	960
catactatgc aatctaaga gattagacgt tcccttcggg gacatggata caggtggtgc	1020
atggttgcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcgaacc	1080
ttattatcag ttgccagcat taagttgggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg	1140
aggaagggtg ggatgacgtc aatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtgct	1200
acaatggatg gtacaacgag ttgcgaactc gcgagagtaa gctaactctt taaagccatt	1260
ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgc tacatgaagt cggaatcgc agtaatcgcg	1320
gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttccc ggccttgta acaccgccc tcacaccatg	1380
agagtttgta acacccaag tcgggtgggt aaccttttag gaaccagecg cctaagggtg	1440
gacagatgat tagggtgaag tcgtaacaag tatgccgttg ccccc	1486

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus plantarum* CJLP133 depositado con el número KCTC 11403BP.
- 5 2. Una composición que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP133 de la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad entérica.
- 10 3. Una composición que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP133 de la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad inmunitaria causada por un desequilibrio de Th1/Th2 en el que hay un exceso de respuesta Th2.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la enfermedad inmunitaria se selecciona de enfermedad alérgica, atopia, cáncer y enfermedades autoinmunitarias.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada por** estar en forma de una medicina.
6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada por** estar en forma de alimentos funcionales saludables.
- 25 7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada por** ser alimento para animales o aditivo para piensos.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizada por** ser un cosmético.

Fig. 1

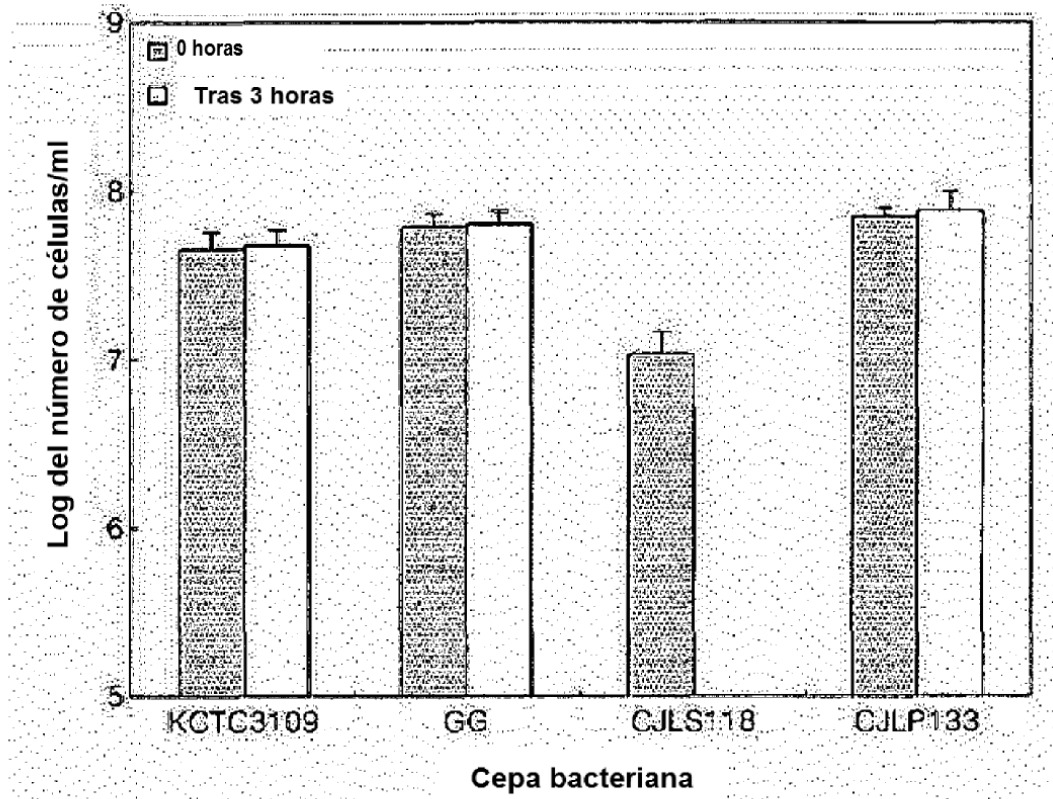


Fig. 2

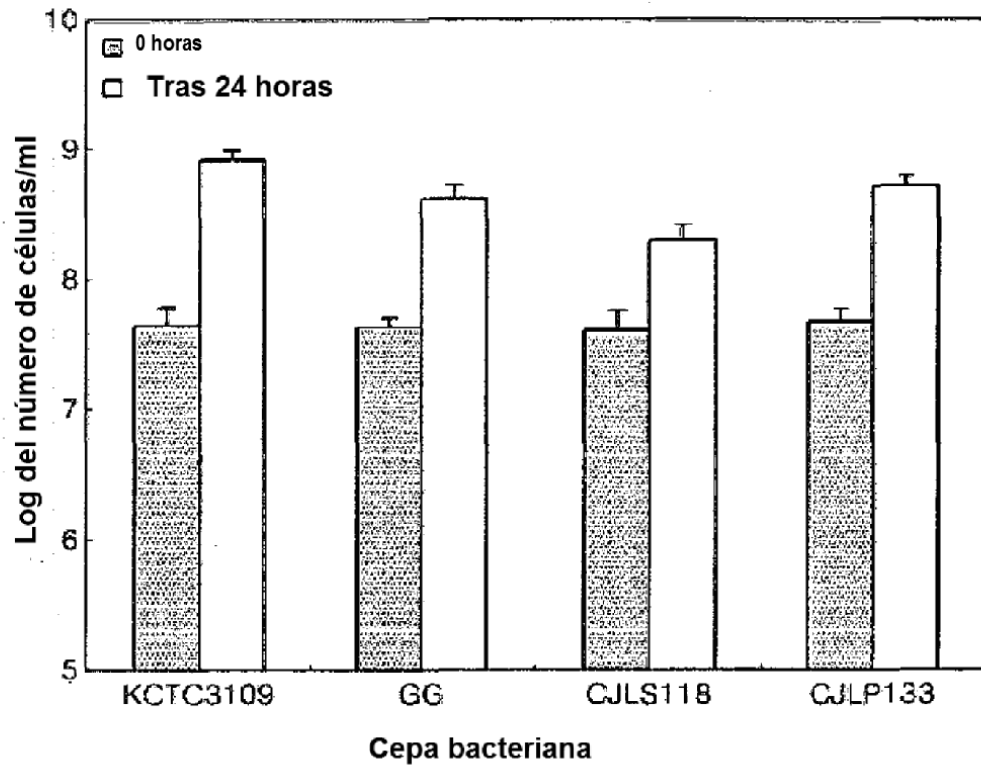


Fig. 3

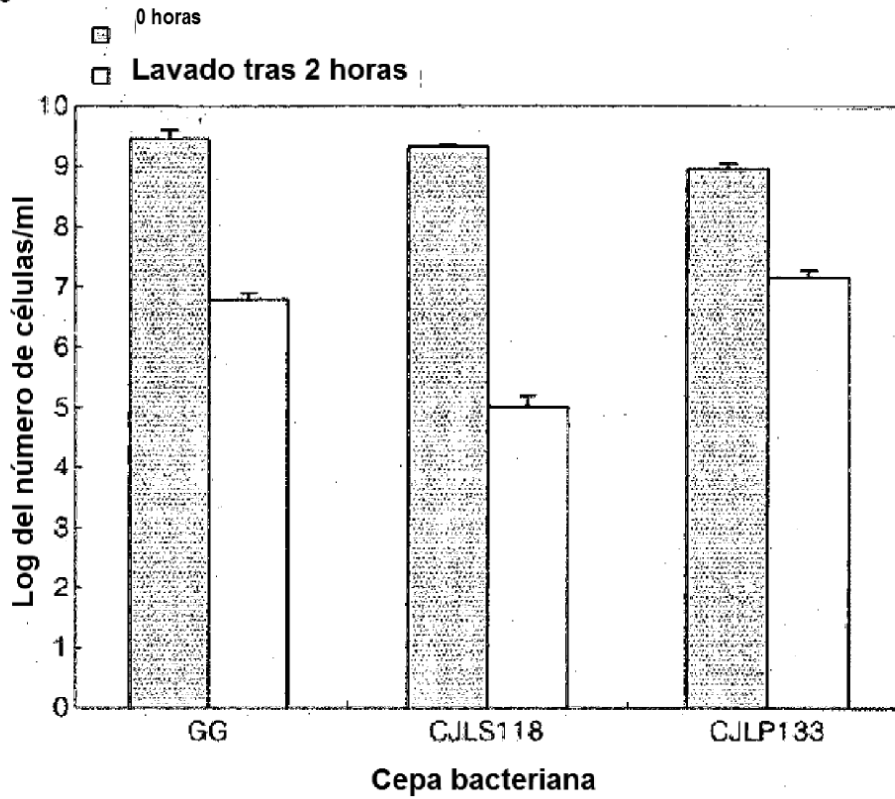


Fig. 4

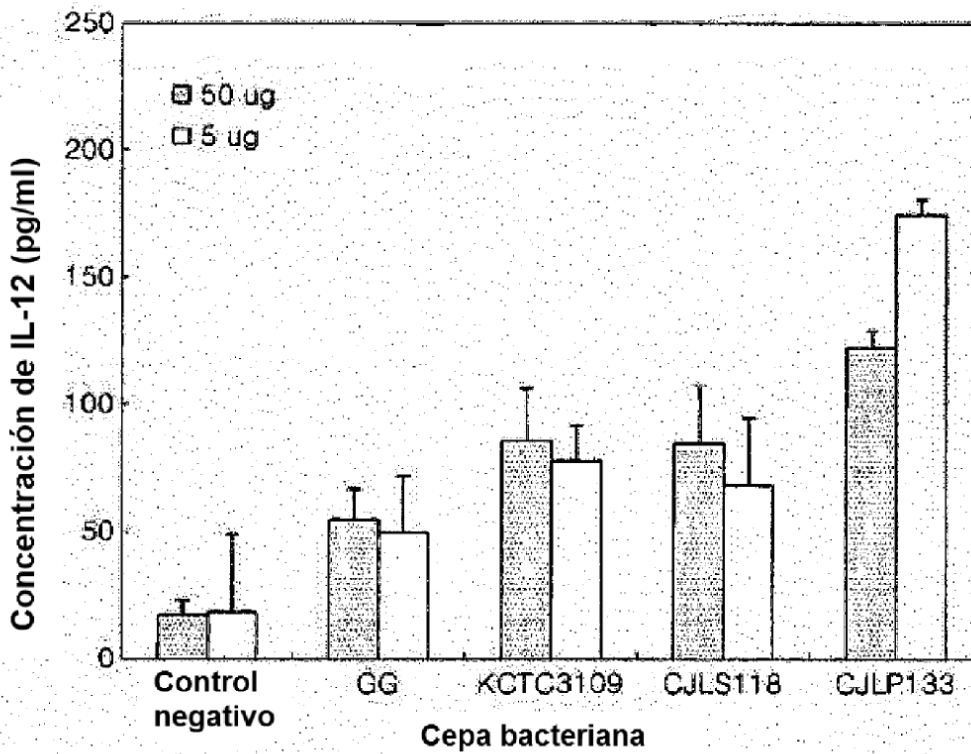


Fig. 5

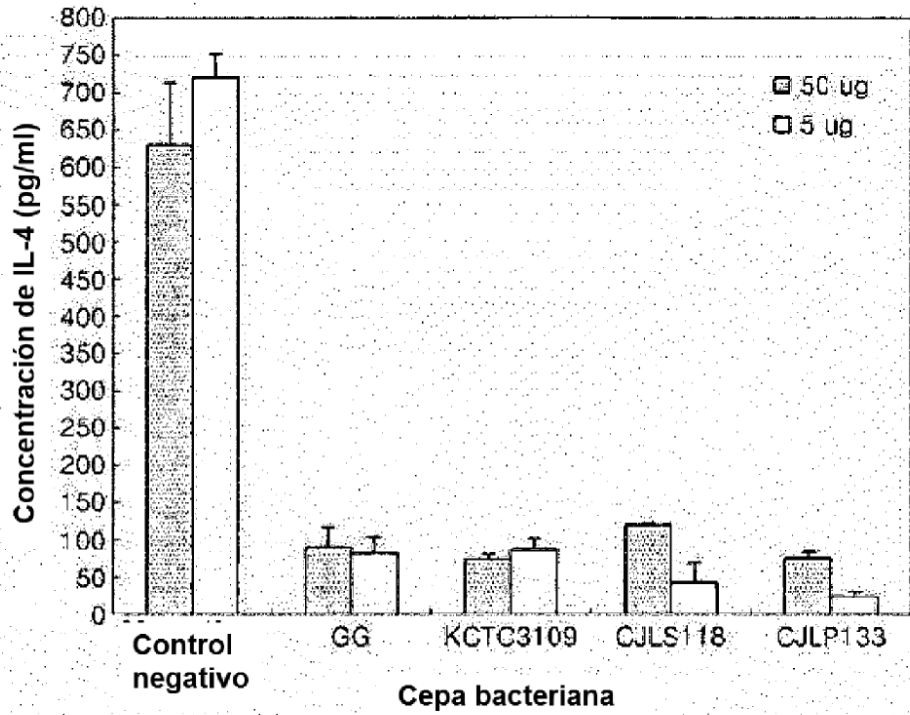


Fig. 6

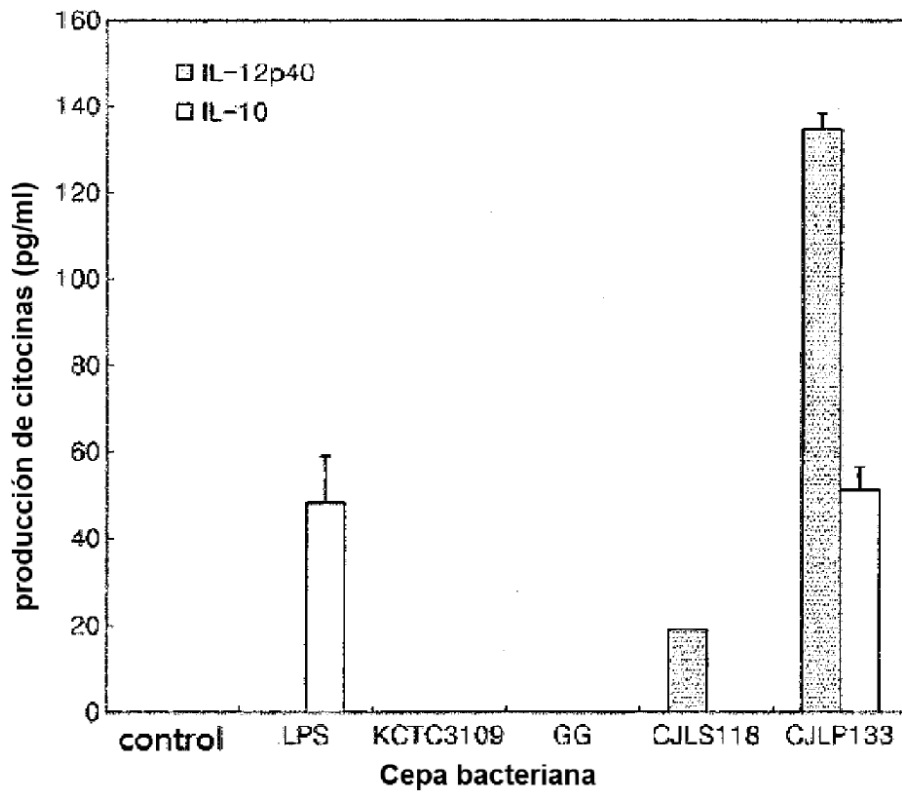


Fig. 7

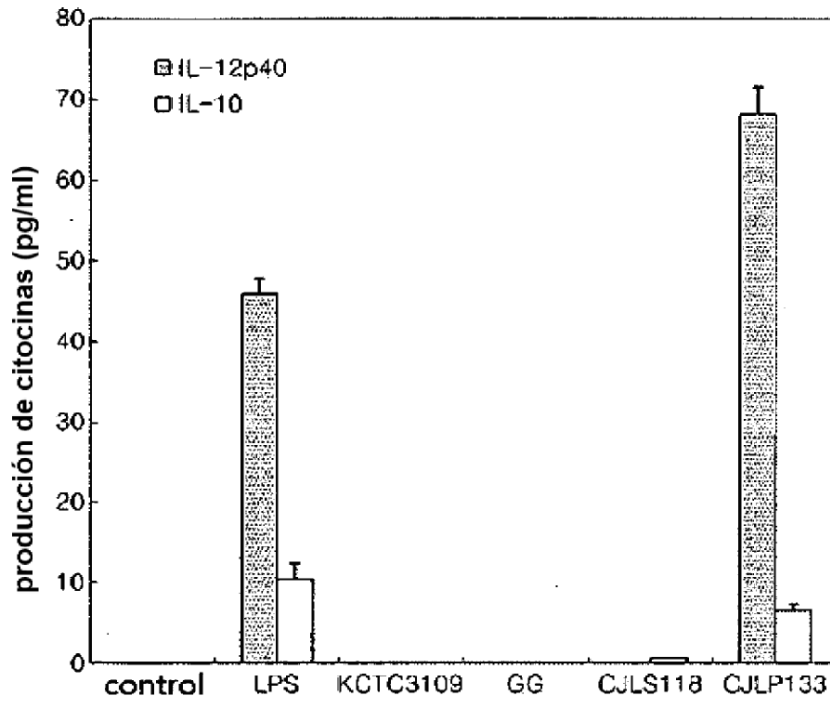


Fig. 8

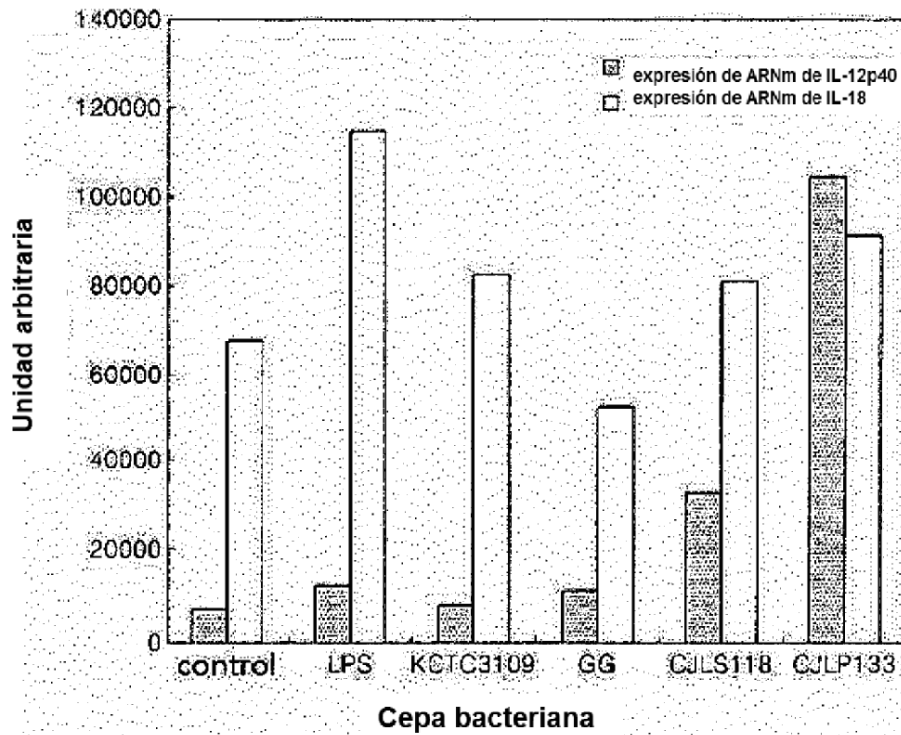


Fig. 9

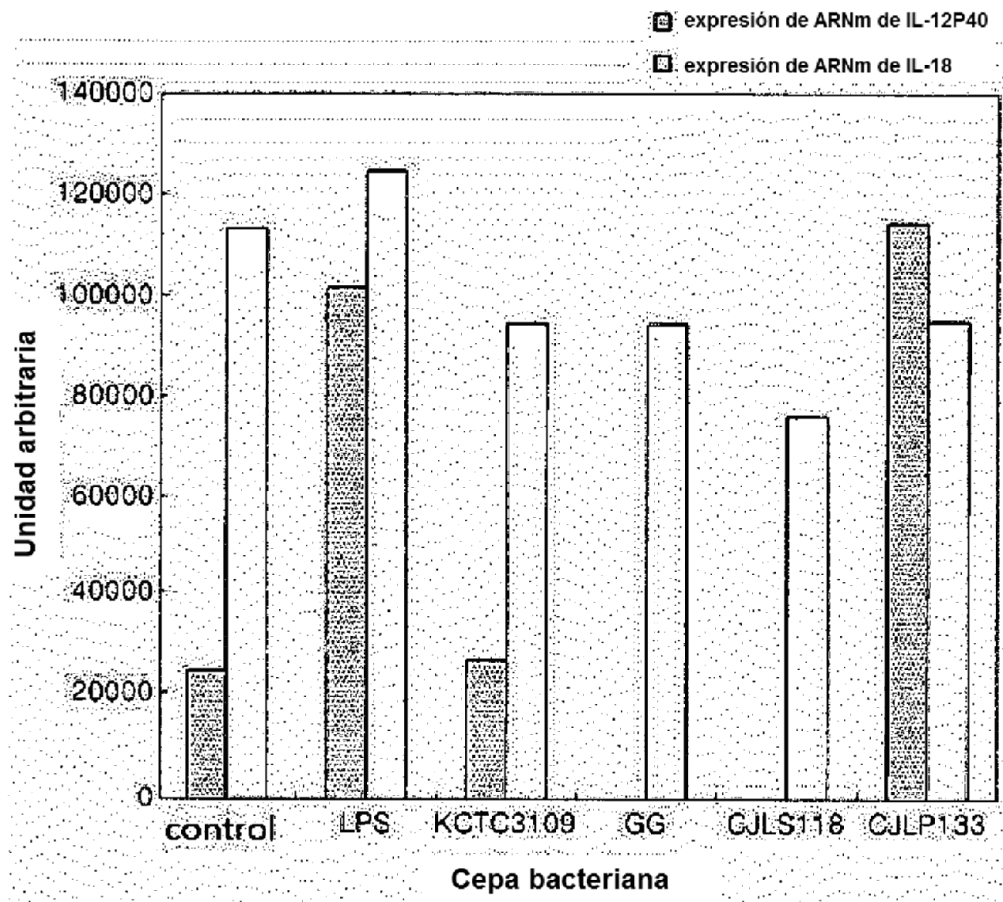


Fig. 10a

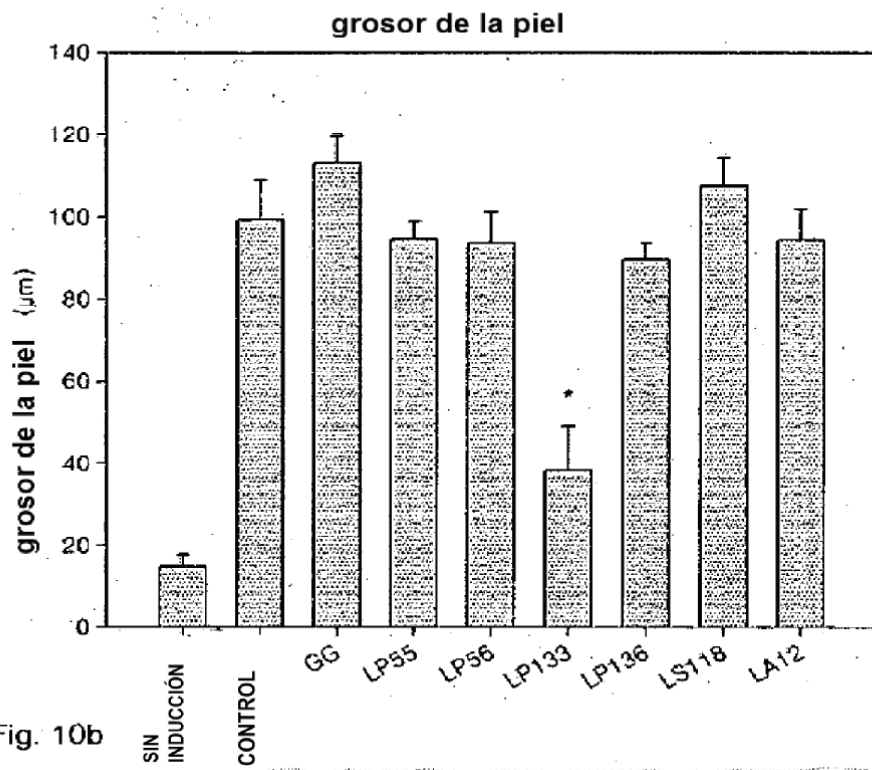


Fig. 10b

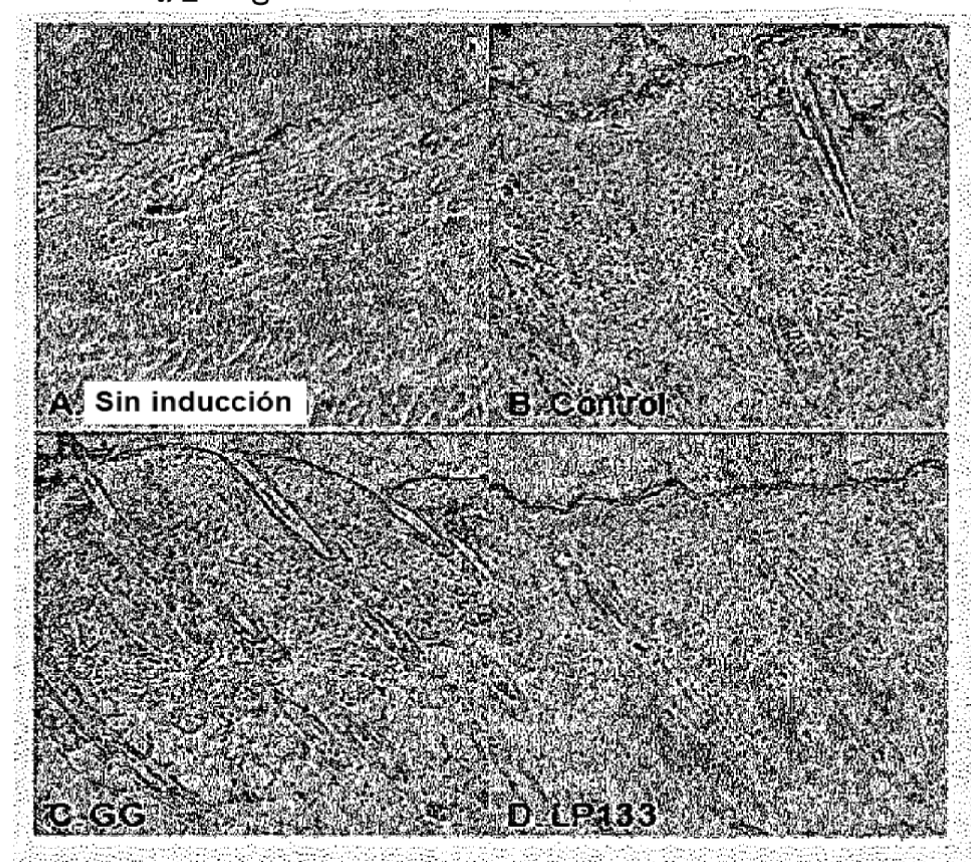


Fig. 11a

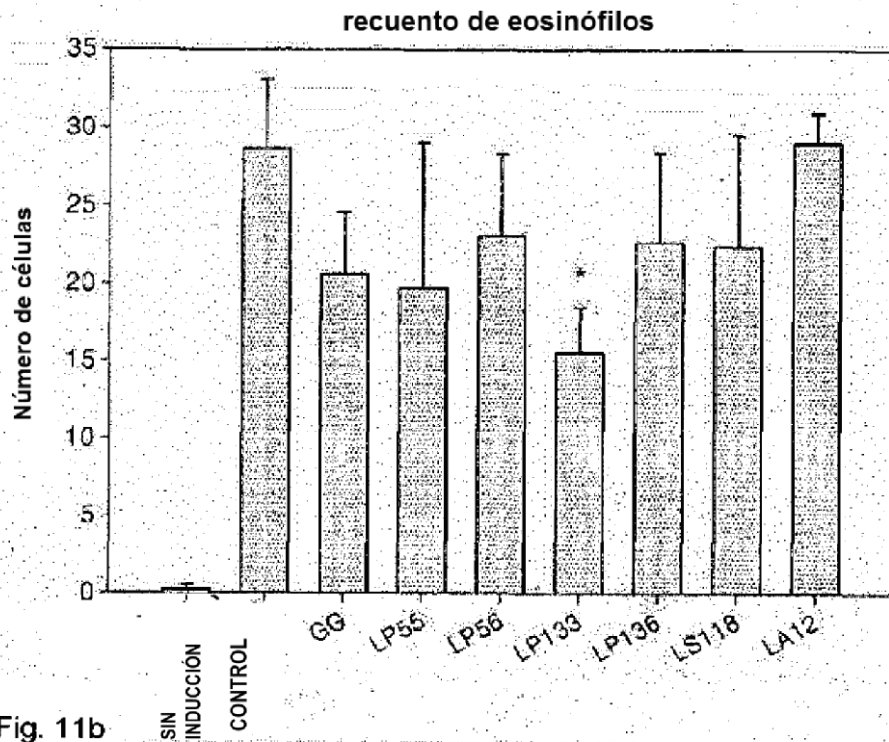


Fig. 11b

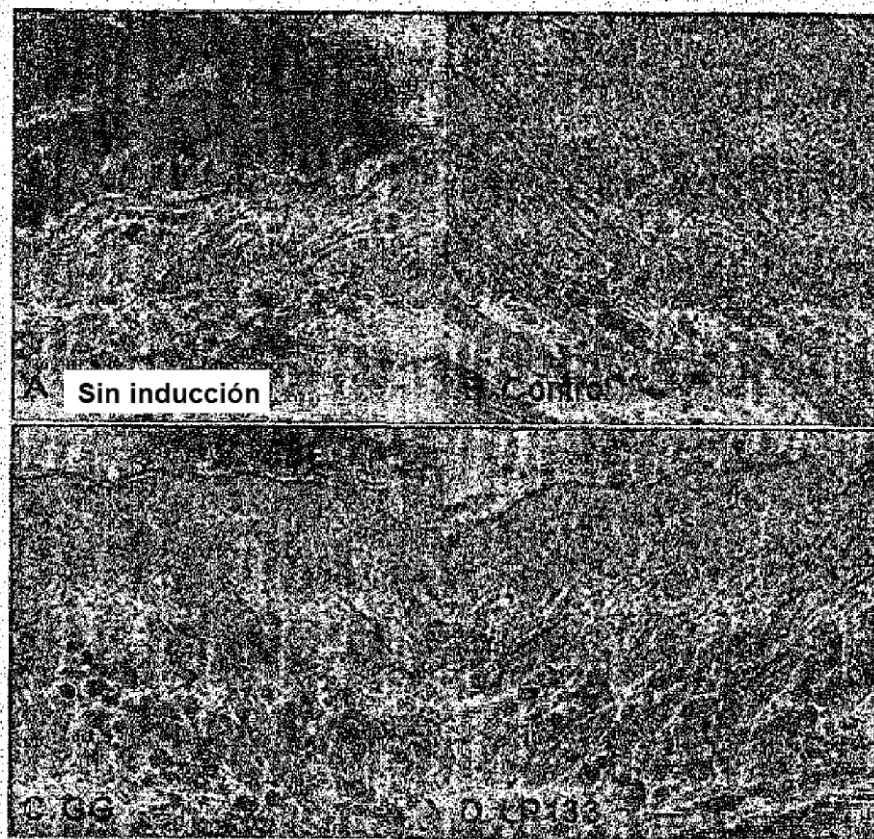


Fig. 12a

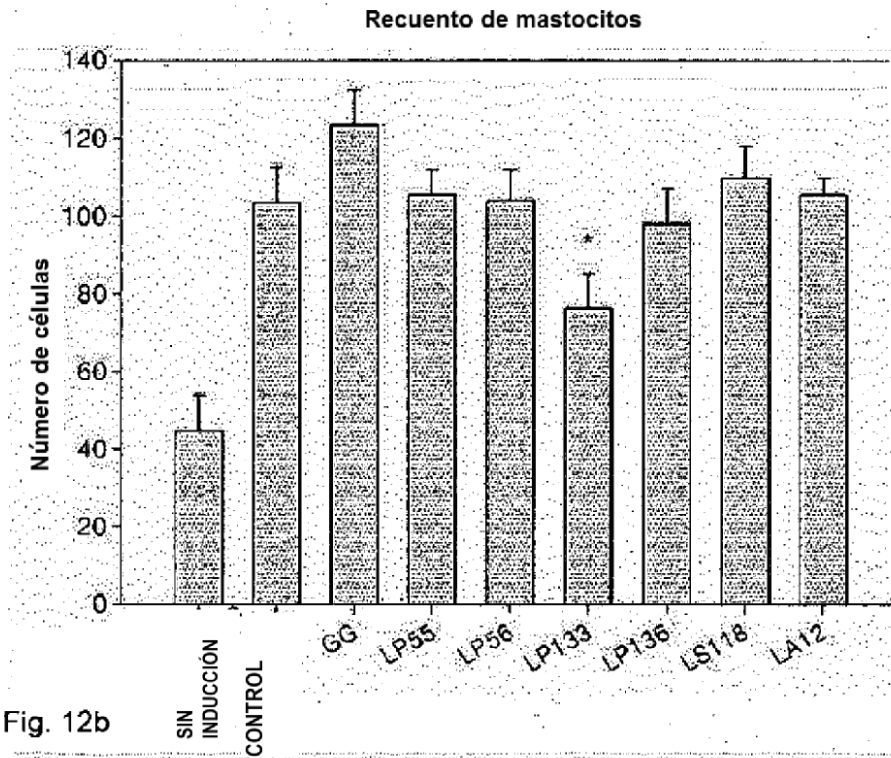


Fig. 12b

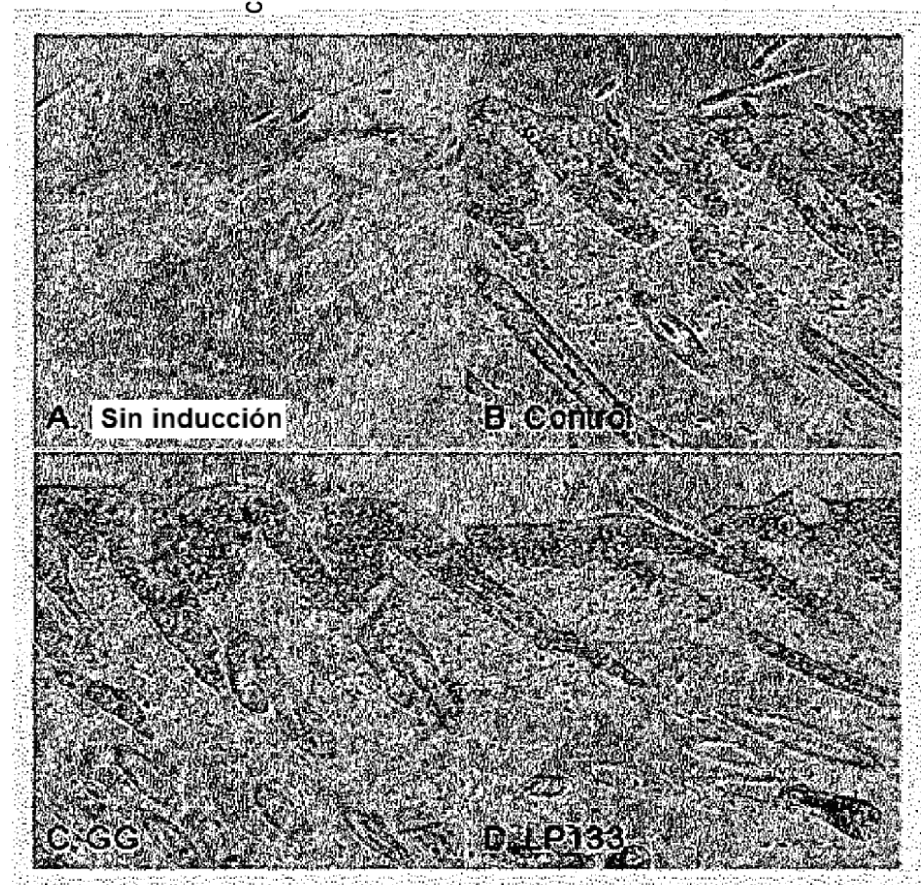


Fig. 13a

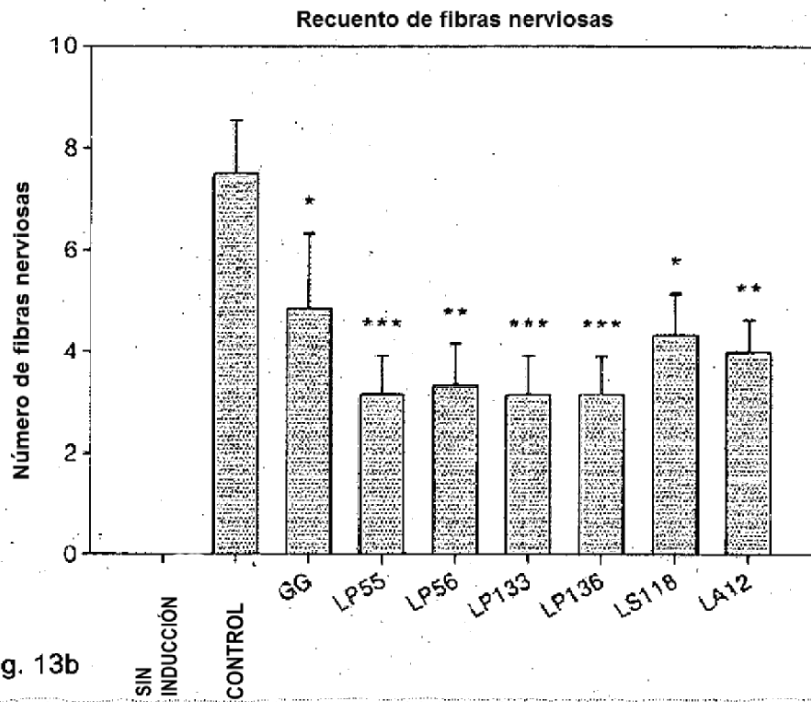


Fig. 13b

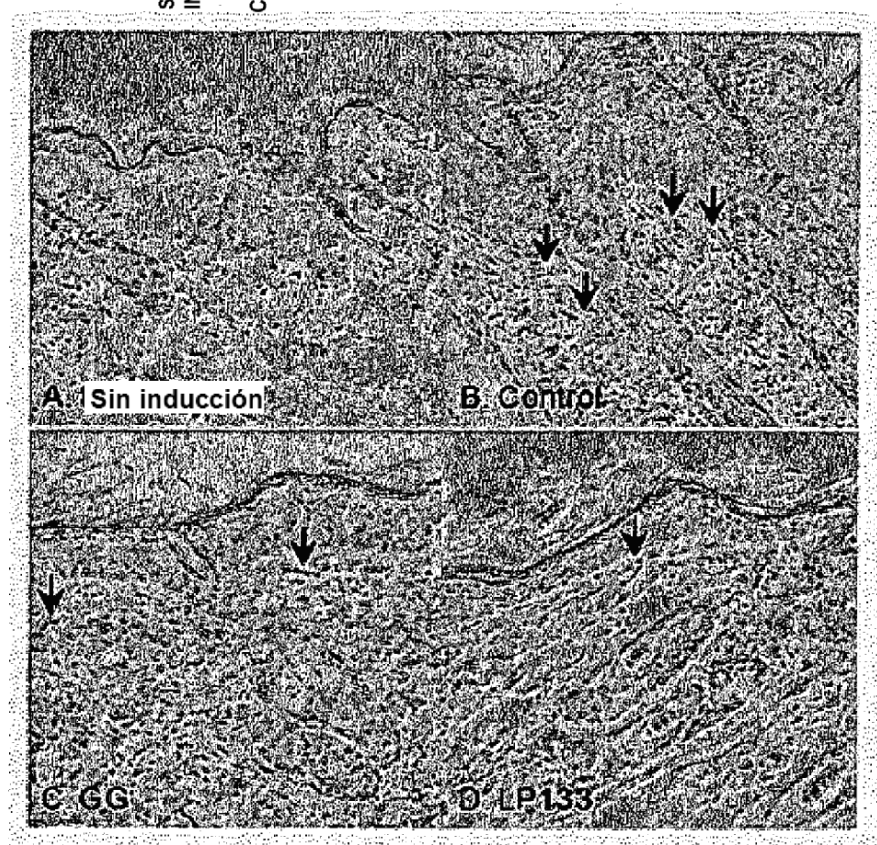


Fig. 14a

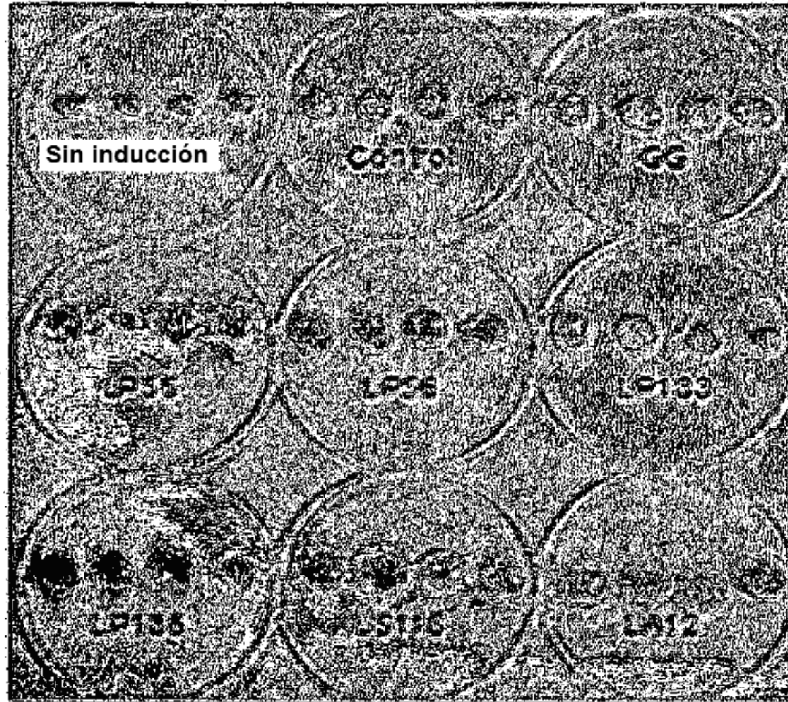


Fig. 14b

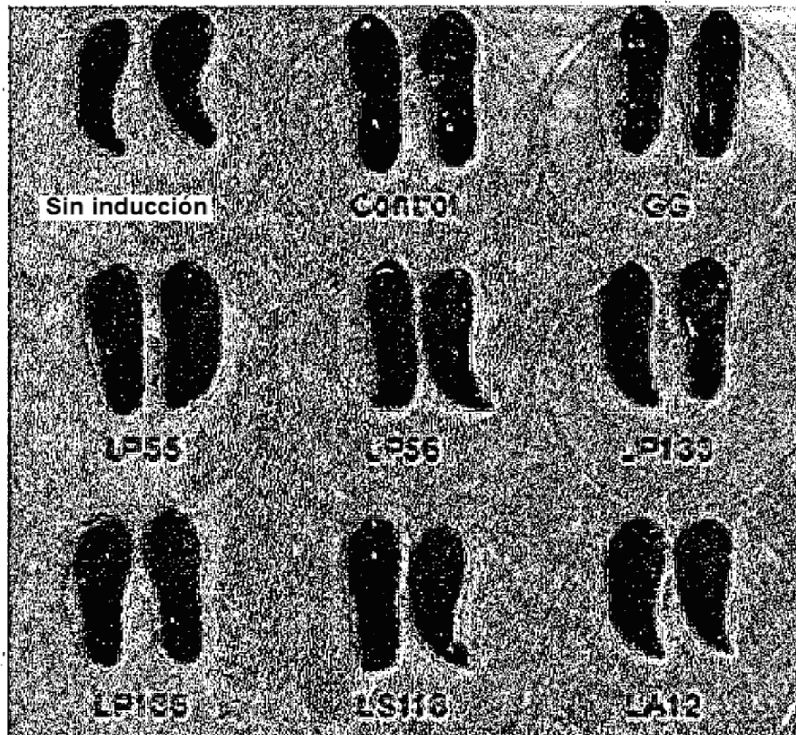


Fig. 15a

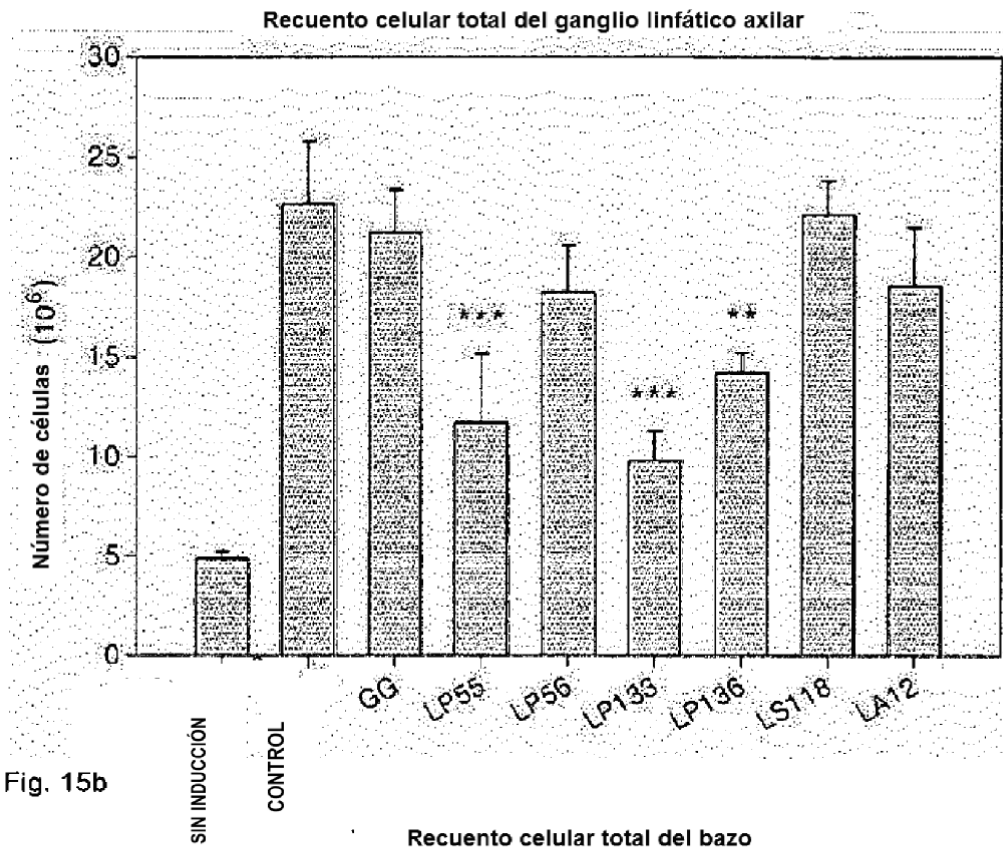


Fig. 15b

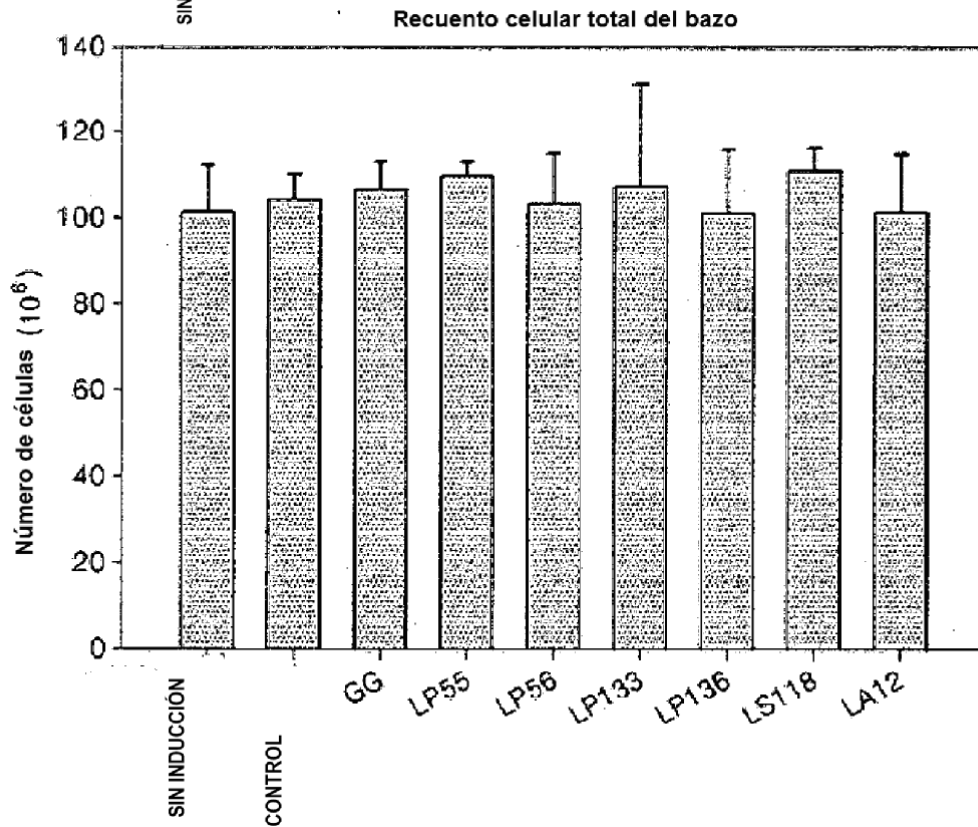


Fig. 16a

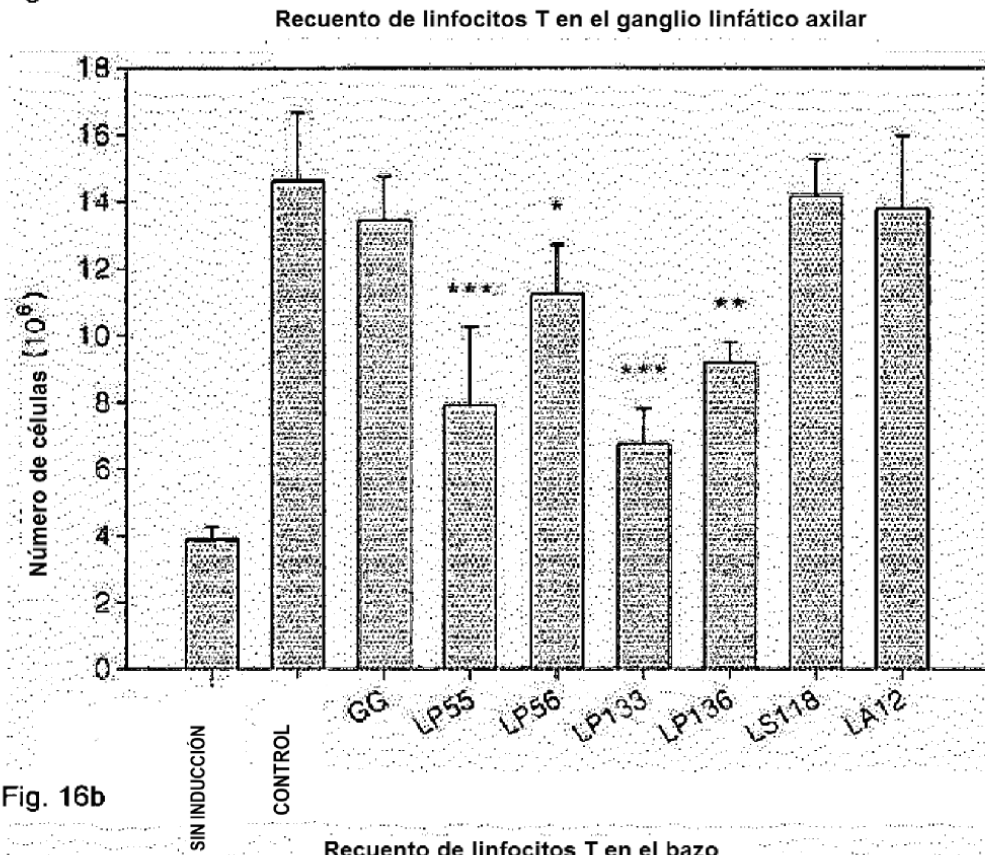


Fig. 16b

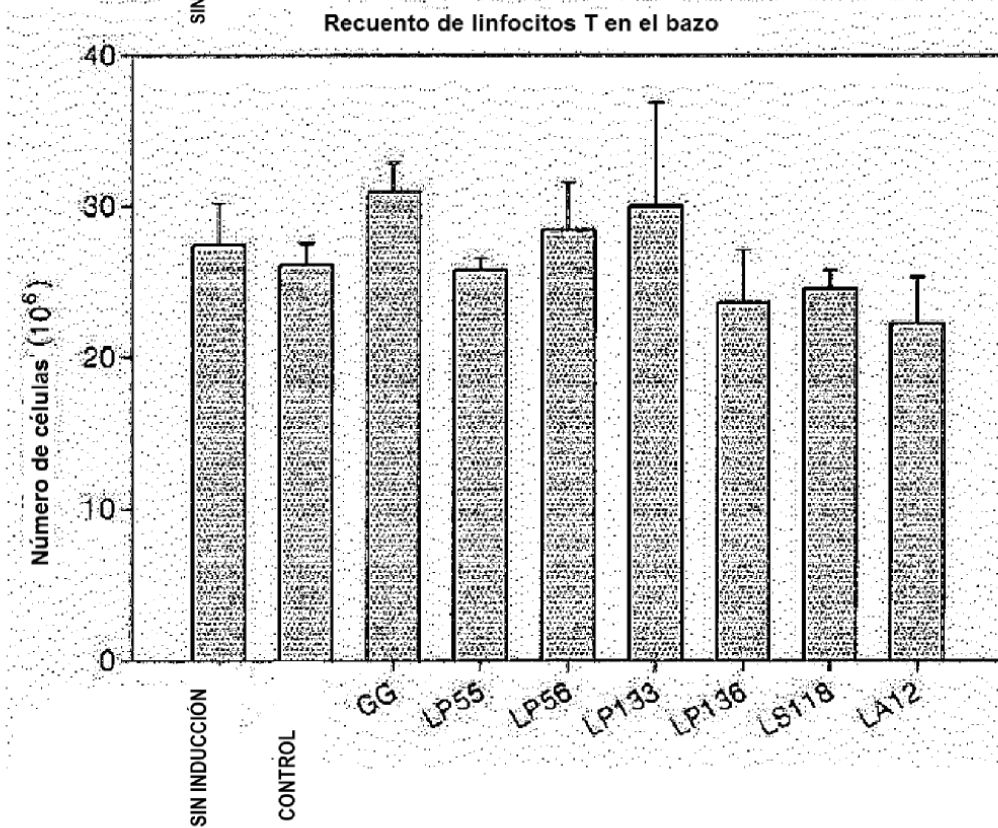


Fig. 17a

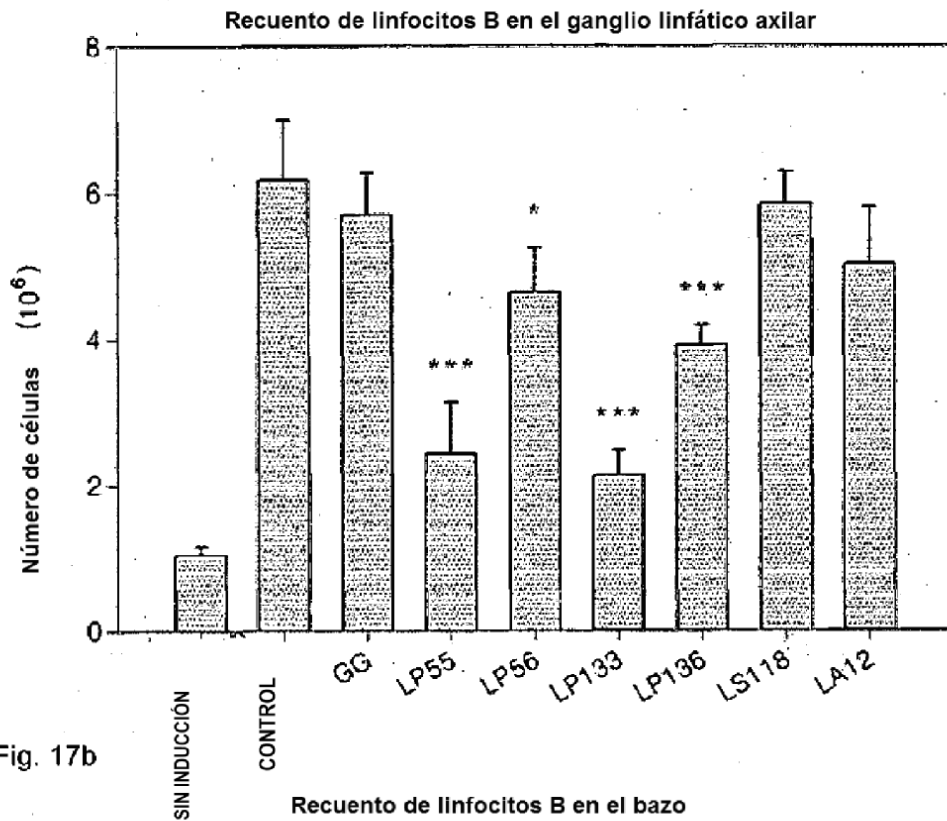


Fig. 17b

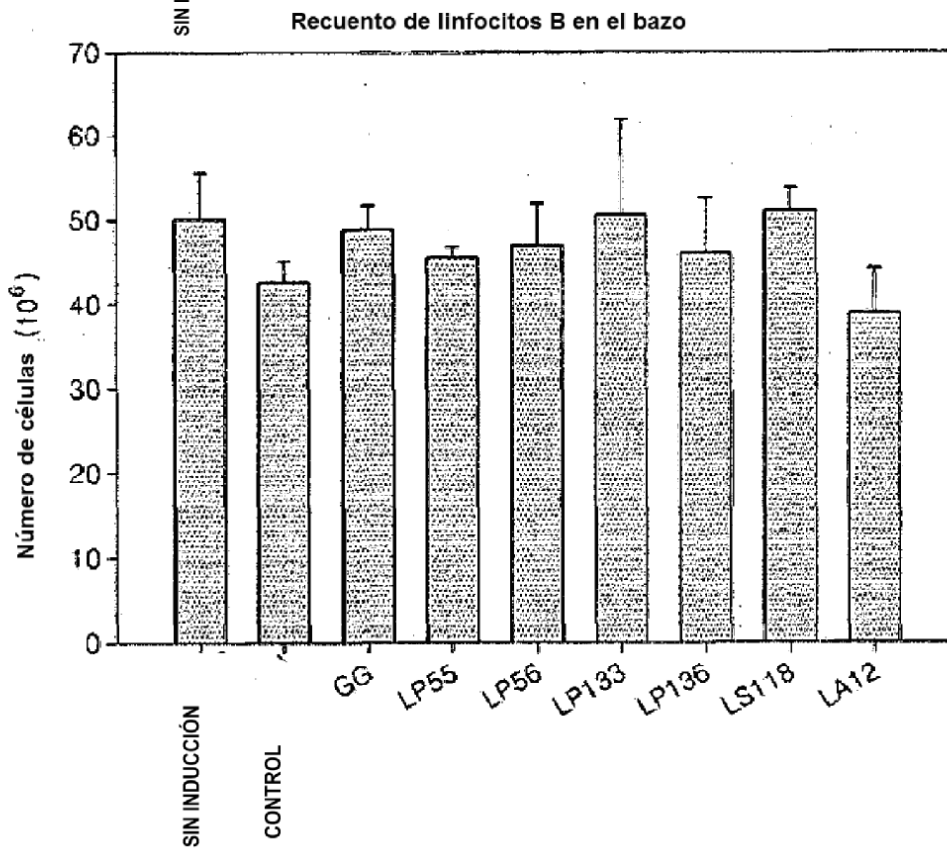


Fig. 18a

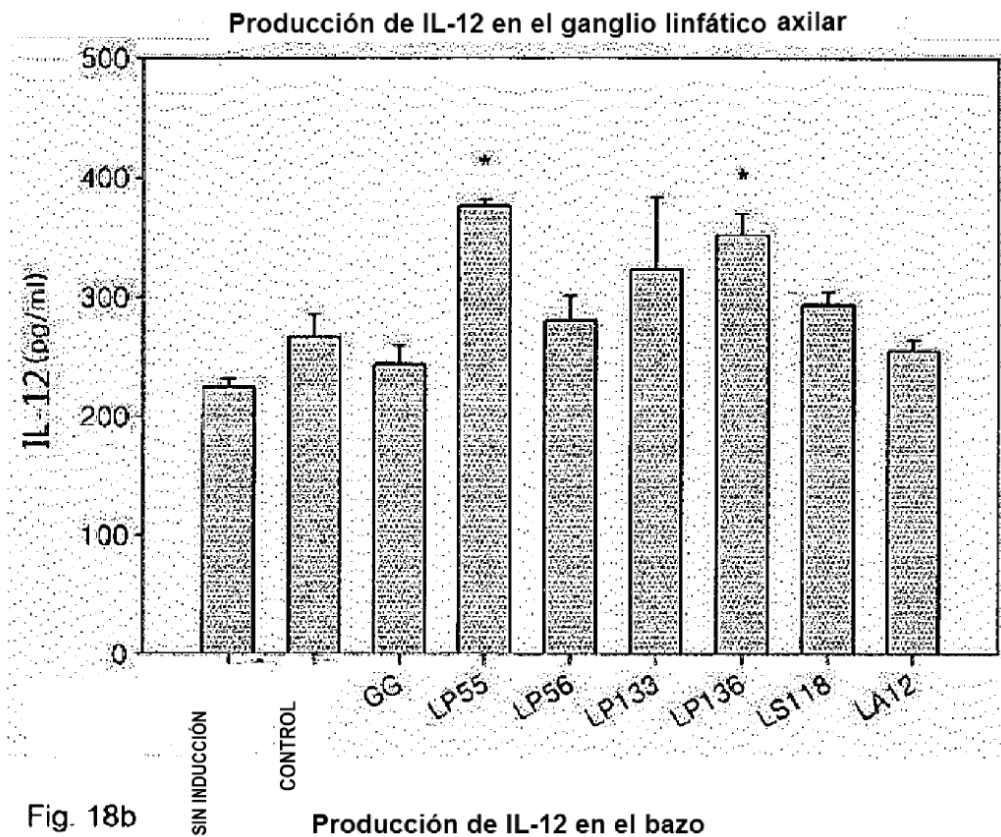


Fig. 18b

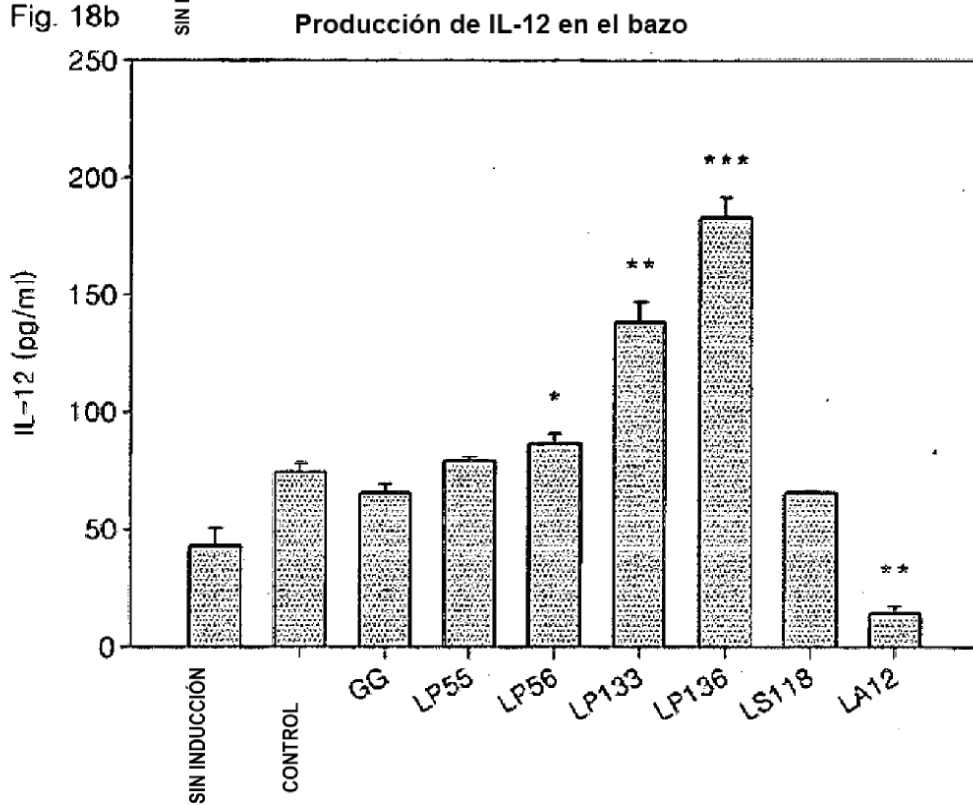


Fig. 19a

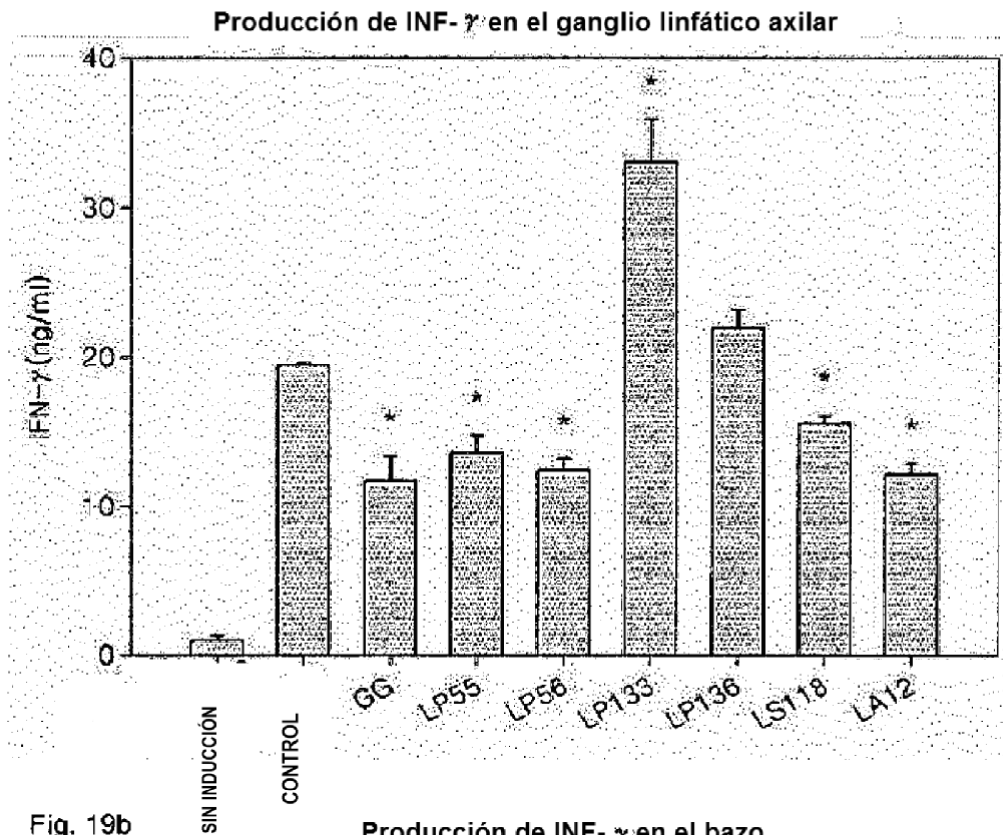


Fig. 19b

