

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 828**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 35/747** (2015.01)

**C12R 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2010 E 10827080 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2494031**

54 Título: **Lactobacillus plantarum novedoso y composición que lo comprende**

30 Prioridad:

**28.10.2009 KR 20090102822**

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

**15.09.2016**

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;  
LEE, KANG PYO;  
KIM, SAE HUN;  
CHUN, TAE HOON;  
HWANG, KWANG WOO y  
WON, TAEJOON**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 582 828 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

**Lactobacillus plantarum** novedoso y composición que lo comprende5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a *Lactobacillus plantarum* novedoso y una composición que lo comprende, y más concretamente, a *Lactobacillus plantarum* novedoso para prevenir o tratar enfermedades intestinales y enfermedades inmunitarias y una composición que lo comprende.

10

**Técnica anterior**

Las bacterias ácido lácticas que se encuentran en los alimentos fermentados tradicionales coreanos, p. ej., kimchi, habitan en el sistema digestivo del cuerpo humano y descomponen materiales fibrosos y proteínas complejas a nutrientes importantes. Los microorganismos viables como las bacterias ácido lácticas son beneficiosos para los tractos gastrointestinales de anfitriones tales como animales, incluyendo seres humanos, debido a que mejoran los entornos de microorganismos intestinales de los anfitriones y se conocen como probióticos. Se requiere que los probióticos tengan una excelente resistencia al ácido y resistencia a la bilis, y una fuerte adherencia a las células epiteliales intestinales, ya que necesitan ser administrados por vía oral, alcancen el intestino delgado y se adhieran a la superficie del intestino delgado con el fin de ser eficaces como probióticos.

Las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus* sp. son probióticos ampliamente encontrados en los alimentos fermentados tradicionales coreanos tales como el Kimchi. Los microorganismos *Lactobacillus* sp. producen ácido láctico bajo homo-fermentación o hetero-fermentación y se encuentran ampliamente distribuidos en el tracto intestinal de los animales, incluyendo seres humanos, y en la fermentación de productos lácteos y verduras. Los microorganismos *Lactobacillus* sp. mantienen un equilibrio de pH ácido para suprimir la propagación de bacterias peligrosas, tales como *E. coli* o *Clostridium* y alivian la diarrea y el estreñimiento. Los microorganismos *Lactobacillus* sp. también sintetizan vitaminas, tienen actividades contra el cáncer, y reducen el colesterol sérico. La acidofilina producida por *Lactobacillus* es conocida por inhibir el crecimiento de *Shigella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E. coli*, o similares. La acidofilina también suprime la propagación de microorganismos causantes de la diarrea y normaliza la flora intestinal previniendo la diarrea (Michael y Philippe, Probiotics and Prebiotics: Effects on diarrhea, The journal of nutrition, Volumen 137, Marzo de 2007, páginas 803S-811S; Roberfroid, Prebiotics and probiotics: Are they functional foods?, American journal of clinical nutrition, Volumen 71, Junio de 2000, páginas 1682S-1687S).

Basándose en las funciones de los microorganismos *Lactobacillus* sp. como se ha indicado anteriormente, se está llevando a cabo activamente la investigación en microorganismos *Lactobacillus* sp. como probióticos y alimentación para ganado. La diarrea bacteriana en el ganado causa mortalidad y una reducción en la tasa de aumento de peso. Por lo tanto, se ha utilizado ampliamente un método de adición de antibióticos a la alimentación del ganado con el fin de prevenir la diarrea bacteriana y aumentar la productividad del ganado. Sin embargo, debido a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos y a los antibióticos que permanecen en el ganado, el uso de antibióticos ha sido limitado y se han recomendado métodos orgánicos de la cría de ganado (Publicación de Patente de Corea Núm. 1998-78358) (McEwen y Fedorka-Cray, Antimicrobial use and resistance in animals, Clinical infectious Diseases, Volumen 34, Junio de 2002, páginas S93-S106).

Además, se sabe que bacterias ácido lácticas tales como el microorganismo *Lactobacillus* sp. tienen efectos que aumentan la respuesta inmunitaria. Y es así como se han llevado a cabo investigaciones sobre el mecanismo de los efectos de las bacterias ácido lácticas sobre los efectos que aumentan la respuesta inmunitaria. A pesar de que los mecanismos específicos aún no se han revelado, se sabe que las bacterias ácido lácticas se administran por vía oral y habitan los intestinos para influir en el sistema inmunitario intestinal. Por ejemplo, se sabe que el consumo de bacterias ácido lácticas a través del yogur aumenta las actividades antibióticas de los linfocitos de las placas de Peyer. Las bacterias ácido lácticas son conocidas por mejorar la respuesta de IgA de acuerdo con la investigación en animales y seres humanos. Además, el sistema inmunitario que representa la resistencia en el organismo contra los patógenos microbianos externos se divide en inmunidad innata e inmunidad adaptativa, ambas las cuales están influenciadas por las bacterias ácido lácticas. De acuerdo con la inmunidad innata del sistema inmunitario intestinal, se sabe que las bacterias ácido lácticas previenen y destruyen agentes patógenos, teniendo por tanto una función de mantenimiento de las condiciones saludables contra la infección. La reacción inmunitaria innata desempeña un papel importante en la supresión del aumento del número de patógenos externos en una etapa temprana de una infección. Además, la reacción inmunitaria innata proporciona antígenos y moléculas co-estimuladoras, induciendo de este modo la activación de la inmunidad adaptativa subsiguiente al sistema inmunitario innato. Los inmunocitos representativos relacionados con la reacción inmunitaria innata incluyen células NK, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (Fearon DT, Locksley RM, Science 1996, 272: 50-53, The instructive role of innate immunity in the acquired immune response). La inmunidad adaptativa induce sustancialmente la eliminación de patógenos externos cuando se infecta un sujeto, y los inmunocitos que corresponden a la inmunidad adaptativa incluyen linfocitos T y linfocitos B. De acuerdo con ello, la resistencia física a los patógenos externos puede depender de la

60

potenciación de la actividad de la inmunidad adaptativa (Gowans JL., Immunology Today. 1996 Jun; 17 (6): 288-91, The lymphocyte - a disgraceful gap in medical knowledge).

De acuerdo con la inmunidad adaptativa, los macrófagos que descomponen antígenos para ponerlos en contacto con los linfocitos T se activan para aumentar la producción de una variedad de citoquinas, en particular, interleuquina, IL-12 e IL-18. En este sentido, algunos componentes de las paredes celulares de bacterias ácido lácticas activan las transferencias de señales NF- $\kappa$ B y STAT en los macrófagos para aumentar la producción de las citoquinas. Además, se sabe que las bacterias ácido lácticas aumentan la producción de IL-12, IL-18 y TNF- $\alpha$  en células presentadoras de antígenos como las células dendríticas encontradas a menudo en los nodos linfáticos y la mucosa del sistema digestivo. Además, las bacterias ácido lácticas son conocidas por aumentar la expresión de una molécula de la superficie en las células dendríticas que activan linfocitos T tales como MHC de clase II y B7-2 (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).

Se ha llevado a cabo mucha investigación sobre la interrelación entre microorganismos *Lactobacillus* sp. y las reacciones inmunitarias. Específicamente, algunos *Lactobacillus* sp. (p. ej. *L. fermentum*) es conocido por mejorar una reacción inmunitaria específica de antígeno, y por lo tanto se probó su uso como adyuvante en vacunas de bacterias (p. ej., difteria, tétanos) o virus (p. ej., gripe, polio) (de Vrese et al., 2005; Olivares et al., 2007; West et al., 2008). Se considera que los efectos potenciadores del sistema inmunitario de microorganismo *Lactobacillus* sp. resulta de la actividad mejorada de linfocitos T productores de citoquinas de tipo Th1 por microorganismos *Lactobacillus* sp. específicos, que inducen eficazmente el crecimiento de las células inmunitarias generales y la actividad de las células T o las células B en la inmunidad adaptativa (Mohamadzadeh et al., Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization., Proc Natl Acad Sci USA. 2005 22; 102(8):2880-2885). Con el fin de medir la actividad mejorada de los linfocitos T, se realiza activamente en los últimos años el estudio de la medición de la cantidad de IFN- $\gamma$  producido (Shida et al, 2006; Foligne et al., 2007). Se sabe que la inducción de crecimiento general de células inmunitarias puede prevenir o tratar la infección del tracto digestivo (intestinal) (Jain S, H Yadav, Sinha PR. Probiotic dahi containing *Lactobacillus casei* protects against *Salmonella enteritidis* infection and modulates immune response in mice. J Med Food. Jun 2009;12(3):576-83.), la infección genitourinaria (Zarate G, Santos V, Nader-Macias ME. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. Infect Dis Obstet Gynecol. 2009;2009:48358. Epub 29 Mar 2007.), la infección respiratoria (Yasuda Y, Matsumura Y, Kasahara K, Ouji N, Sugiura S, Mikasa K, Kita E. Microbial exposure early in life regulates airway inflammation in mice after infection with *Streptococcus pneumoniae* with enhancement of local resistance. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 25 Sep 2009 [Epub antes de la edición impresa]), la infección por *Helicobacter* (Boyanova L, Stephanova-Kondratenko M, Mitov I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains: preliminary report. Lett Appl Microbiol. Mayo 2009;48(5):579-84. Epub 9 Mar. 2009), y las reacciones alérgicas (Ouweland AC, Nermes M, Collado MC, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. World J Gastroenterol. 14 Jul 2009;15(26):3261-8).

Los linfocitos T controlan la inmunidad adaptativa, que se pueden clasificar en una respuesta Th1 como inmunidad celular y una respuesta Th2 como inmunidad humoral. Las respuestas Th1 y Th2 producen diferentes citoquinas en las células presentadoras de antígenos. En la respuesta Th1, la producción de IL-2, IL-12, IL-18, interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) es dominante. En la respuesta Th2, la producción de PGE2, IL-4 e IL-10 es dominante. Se requiere equilibrar las respuestas Th1 y Th2. Si las respuestas Th1 y Th2 no están en equilibrio, se producen diversas enfermedades inmunitarias. Las células Th1 combaten principalmente con patógenos, pero las células Th2 están principalmente relacionadas con las alergias y las respuestas inflamatorias. Cuando las respuestas Th1 y Th2 están en condiciones normales, las células Th2 protegen al cuerpo humano de polvo y materiales no deseados. Sin embargo, si las células Th2 responden excesivamente, la producción de IgE anticuerpos se incrementa, lo que provoca las respuestas alérgicas a proteínas que no son peligrosas para el cuerpo humano, tales como el polen y alimentos. Por lo tanto, la proporción de las respuestas Th1 y Th2 debe ser equilibrada. La respuesta excesiva o insuficiente de una de ellas provoca enfermedades. Además, la secreción continua de cortisol debido a estrés continuo reduce la respuesta Th1 y aumenta la respuesta Th2, lo que provoca cáncer, enfermedades atópicas, alergias y enfermedades autoinmunitarias (Elenkov y Chrousos, Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism, Volumen 10, Noviembre de 1999, páginas 359-368).

De acuerdo con experimentos *in vivo*, las bacterias ácido lácticas aumentan la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  que son citoquinas Th1 en los linfocitos T y suprimen la producción de IL-4 y IL-5 que son citoquinas 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 de 1998, páginas 48-53). Mientras tanto, IL-12 e IL-18 son citoquinas importantes para diferenciar los linfocitos Th0 a linfocitos Th1 y son producidas en los macrófagos o células dendríticas. Se sabe que aumentan la producción de IL-12, IL-18 e IFN- $\alpha$ , aumenta dependiendo de la concentración de bacterias ácido lácticas, cuando los esplenocitos o los macrófagos son tratados con bacterias ácido lácticas durante el cultivo. Como tales, las bacterias ácido lácticas aumentan la producción de IL-12, IL-18 e IFN- $\alpha$  en los macrófagos, promoviendo

así la diferenciación de Th0 a Th1 y la inducción de la formación de IFN- $\gamma$  y por lo tanto las bacterias ácido lácticas juegan un papel en el equilibrio de Th1/Th2 en un estado cebado de respuesta Th2 (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). Por lo tanto, se sabe que las bacterias ácido lácticas previenen y tratan cánceres, enfermedades atópicas, alergias y enfermedades autoinmunitarias inducidas por el desequilibrio de Th1/Th2 causado por la respuesta excesiva de Th2.

Murosaki et al. (J. Allergy Clinical Immunology, 1998, 102: 57-64) describen la capacidad de una cepa *L-137* de *Lactobacillus plantarum* destruida por calor para suprimir la producción de IgE específica de antígeno alimentado naturalmente mediante estimulación de la producción de IL-12 en ratones. Por este medio, los autores describen la regulación inducida por *L. plantarum* de citoquinas, pero no dicen nada sobre el hecho de que regula la proliferación de células T.

El documento US 2007/0148148 A1 se refiere a la cepa PTA-4799 de *L. plantarum* específica. En el capítulo la solicitud ilustra que esta cepa puede inducir citoquinas tales como IL-10, gamma-IFN o TNF- $\alpha$  en células mononucleares de sangre periférica cultivadas *in vitro*, sin proporcionar ningún dato para esta supuesta inducción. Además esta solicitud no dice nada sobre la posibilidad de regular el desequilibrio de Th1/Th2 mediante el uso de una cepa de *L. plantarum*.

El documento EP 1 880 726 A1 se refiere a agentes de modulación de la función inmunitaria y describe la capacidad de las cepas MEP170401 a MEP170406 de *L. plantarum* para inducir ciertas citoquinas de tipo Th1. Cabe destacar que esta solicitud también ilustra la baja resistencia al ácido gástrico de estas cepas (capítulo y Tabla 1), que argumenta en contra de su uso como probióticos.

El documento JP 2007 117031 A se refiere a la utilización de leche fermentada para ajustar el equilibrio de Th1/Th2 para desplazarlo a la dominancia de Th1. Como ingredientes de la leche fermentada a la aplicación ilustra cuatro especies de bacterias diferentes, entre ellas *Lactobacillus plantarum* sin mostrar qué especie de bacteria y qué cepa específica es responsable de la supuesta función moduladora del sistema inmunitario.

## Descripción de la invención

### Problema técnico

Mientras buscaban bacterias ácido lácticas novedosas que tuvieran excelentes actividades potenciadoras del sistema inmunitario en comparación con las bacterias ácido lácticas convencionales, los autores de la presente invención aislaron e identificaron bacterias *Lactobacillus* sp. aisladas de los alimentos fermentados tradicionales de Corea.

Por lo tanto, la presente invención proporciona cepas de bacterias *Lactobacillus* sp. que tienen excelentes efectos en la potenciación de la respuesta inmunitaria, en particular, excelentes actividades para promover la producción de IFN- $\gamma$ , una citoquina de tipo Th1, que induce la proliferación de células inmunitarias generales, y contrarrestar el desequilibrio de Th1/Th2 causado por una respuesta excesiva de Th2, así como tienen excelente resistencia al ácido y a la bilis y una fuerte adherencia a las células epiteliales intestinales que constituyen las propiedades básicas de los probióticos.

La presente invención también proporciona una composición para prevenir o tratar enfermedades intestinales, que comprende cepas de bacterias *Lactobacillus* sp..

La presente invención también proporciona una composición para potenciar la respuesta inmunitaria, que comprende cepas de bacterias *Lactobacillus* sp..

### Solución al Problema

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona *Lactobacillus plantarum* CJLP243 (depositado en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM), fecha de Depósito: 14 de octubre 2009, Núm. de depósito: KCCM11045P).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para prevenir o tratar enfermedades intestinales, que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para potenciar la respuesta inmunitaria, que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá más completamente con referencia a los dibujos adjuntos, en los

que se muestran realizaciones ilustrativas de la invención.

El *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de acuerdo con un aspecto de la presente invención es una cepa novedosa de *Lactobacillus plantarum* aislada e identificada a partir de alimentos fermentados tradicionales de Corea. La comida fermentada tradicional coreana puede ser kimchi, hortalizas fermentadas, pasta de soja, salsa de soja, chungkookjang, pescado fermentado, o similares, pero no está limitada a los mismos.

Un resultado de un análisis de la secuencia de bases del ARNr 16S para identificar y clasificar *Lactobacillus plantarum* mostró que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 tenía la homología más alta (99,9%) con una cepa estándar de *Lactobacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891<sup>T</sup>, Número de acceso GenBank AB326351) y mostró la relación filogenética molecular más estrecha con *Lactobacillus plantarum*. Por lo tanto, el susodicho microorganismo fue identificado como *Lactobacillus plantarum*, denominado *Lactobacillus plantarum* CJLP243, y depositado en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el (Núm. de Depósito: KCCM11045P) de 14 de Octubre de 2009. La secuencia de bases de un gene de ARNr 16S de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 se muestra en el SEC ID NO: 1 en la lista de secuencias adjunta.

El *Lactobacillus plantarum* CJLP243 es una bacteria gram-positiva y un anaerobio facultativo que puede crecer en condiciones aerobias y anaerobias, no produce esporas, no tiene motilidad, y tiene forma de varilla. Las propiedades morfológicas y fisiológicas específicas de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 han sido analizadas de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

[Tabla 1]

Propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas	Resultados
Morfología	Varilla
Motilidad	-
Espora	-
Catalasa	-
Homo-hetero fermentación	heterofermentación facultativa
Proliferación a 10°C	+
Proliferación a 42°C	+
Proliferación en NaCl al 7%	+
Proliferación en NaCl al 10%	-
Proliferación a pH 3,8	+
Proliferación en condiciones anaerobias	+
Producción de CO <sub>2</sub> utilizando glucosa	-
Fermentación de azúcar	
Glicerol	-
Eritritol	-
D-arabinosa	-
L-arabinosa	+
Ribosa	+
D-xilosa	-
L-xilosa	-
Adonitol	-
Xilósido	-
Galactosa	+
D-glucosa	+
D-fructosa	+

ES 2 582 828 T3

Propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas	Resultados
D-manosa	+
L-sorbosa	-
Ramnosa	+
Dulcitol	-
Inositol	-
Manitol	+
Sorbitol	+
D-manósido	+
D-glucósido	+
Glucosamina	+
Amigdalina	+
Alutina	+
Esculina	+
Salicina	+
Celobiosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Melibiosa	+
Sacarosa	+
Trehalosa	+
Inulina	+
Melicitosa	+
D-rafinosa	+
Almidón	-
Glucógeno	-
Xilitol	-
Gentiobiosa	-
D-turanosa	-
D-lixosa	-
D-tagatosa	-
D-fucosa	-
L-fucosa	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Gluconato	-
2-gluconato	-
5-gluconato	-
+: Positivo -: Negativo	

Con el fin de preservar de forma estable *Lactobacillus plantarum* CJLP243 durante un largo periodo de tiempo, las cepas se puede conservar dispensándolas en una solución de conservación preparada mezclando agua y glicerol y el almacenando la dispersión a -70°C, o suspendiéndola en leche desnatada esterilizada al 10% y liofilizando la suspensión .

5 Además, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 es un probiótico que es eficaz para el alivio de trastornos intestinales y la potenciación de la respuesta inmunitaria que son efectos generales de las bacterias ácido lácticas.

10 En este sentido, un probiótico es un microorganismo viable beneficioso para los tractos gastrointestinales de anfitriones tales como animales incluyendo seres humanos mediante la mejora de los entornos intestinales. Los probióticos, que son microorganismos vivos que tienen actividades probióticas en una cepa simple o compleja, son beneficiosos para la flora intestinal cuando se administran a seres humanos o animales en forma seca o fermentados. El microorganismo probiótico no debe ser influenciado por el jugo gástrico y la bilis, y se requiere que sea viable en el intestino después de pasar a través del estómago, habite el intestino, y sea beneficioso para la flora intestinal de un anfitrión. Por lo tanto, el microorganismo probiótico debe tener resistencia al ácido y resistencia a la bilis excelentes, y una fuerte adherencia a las células epiteliales intestinales. Además, se requiere que el microorganismo probiótico sea estable. En este sentido, se llevan a cabo una prueba de licuefacción de gelatina, una prueba de fenilalanina desaminasa, una prueba de formación de amoníaco, una prueba de hemólisis, o similares. El *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de acuerdo con la presente realización es negativo para el ensayo de licuefacción de la gelatina, el ensayo de fenilalanina desaminasa, y el ensayo de formación de amoníaco, y muestra  $\alpha$ -hemólisis indicando que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 no es un patógeno (remitirse al Ejemplo 4), tiene una excelente resistencia al ácido y resistencia a la bilis, y muestra una fuerte adherencia a las células epiteliales intestinales (remitirse a los Ejemplos 2 y 3).

25 *Lactobacillus plantarum* CJLP243 puede tener excelentes efectos en el alivio de trastornos intestinales debido a la resistencia al ácido y la resistencia a la bilis excelentes, y muestra una fuerte adherencia a las células epiteliales intestinales.

30 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención proporciona una composición para prevenir o tratar enfermedades intestinales, que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

35 La composición para el tratamiento de enfermedades intestinales que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP243 puede aplicarse para prevenir o tratar enfermedades intestinales de mamíferos incluyendo seres humanos, por ejemplo, ganado incluyendo vacas, caballos y cerdos. Tales enfermedades intestinales incluyen infecciones intestinales por bacterias peligrosas para entornos intestinales y enfermedades inflamatorias del intestino, por ejemplo, diarrea infecciosa causada por microorganismos patógenos (*E. coli*, salmonella y clostridium), gastroenteritis, enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome de enteritis psicógena, crecimiento excesivo de microorganismos en el intestino delgado, diarrea, o similares, pero no se limita a las mismas. Los *Lactobacillus plantarum* CJLP243 contenidos en la composición para el tratamiento de enfermedades intestinales pueden ser bacterias vivas o muertas, y preferiblemente bacterias vivas. En general, las bacterias vivas tratan o aliviar los síntomas generales causados por la fermentación anormal en la flora intestinal, habitan el tracto intestinal para evitar que las bacterias peligrosas se adhieran a los tractos intestinales en seres humanos y animales, y producen ácido láctico para bajar el pH intestinal, suprimiendo de ese modo la proliferación de bacterias peligrosas. Además, las bacterias vivas administradas producen peróxidos con bacteriocina para suprimir la proliferación de bacterias peligrosas y ayudar a la actividad de las vellosidades intestinales para absorber los nutrientes. Además, las bacterias vivas pueden producir materiales que ayudan a la absorción y utilización de nutrientes, mejoran los requisitos de alimentación del ganado, y producen materiales que neutralizan materias tóxicas producidas por los patógenos.

50 La composición para prevenir o tratar las enfermedades intestinales se puede administrar por vía oral, pero el método de administración de la composición no está limitado. La dosis puede variar de acuerdo con los tipos de enfermedad intestinal, el grado de gravedad, la edad, el sexo y el origen étnico de los pacientes, y los propósitos del tratamiento o la prevención. En general, se puede administrar de 10 millones a 100 mil millones de bacterias a un adulto.

55 Además, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 tiene excelentes efectos en la potenciación de la respuesta inmunitaria, así como efectos en el alivio de trastornos intestinales en comparación con las bacterias ácido lácticas convencionales. Se encuentra que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 promueve la producción de citoquinas de tipo IFN- $\gamma$ , Th-1, induciendo con ello la mejora de la inmunización de tipo Th-1. Los efectos sobre la potenciación de la respuesta inmunitaria de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 se describirá ahora con más detalle.

60 Cuando las células inmunitarias aisladas de un bazo de un ratón se trataron con *Lactobacillus plantarum* CJLP243, activaron el crecimiento de las células inmunitarias generales inducidas por la respuesta Th2 (Ejemplo 5), y el aumentaron la producción de citoquinas de tipo IFN- $\gamma$ , Th1 (Ejemplo 6 ). Se encuentran que la activación del crecimiento de células inmunitarias y los efectos potenciadores de la reacción inmunitaria de tipo Th1 es

significativamente ventajosa sobre otras bacterias ácido lácticas convencionales tales como *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033). Además, cuando se administró por vía oral *Lactobacillus plantarum* CJLP243 a los ratones durante 8 semanas, se demostró que aumentaba la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, una citoquina de tipo Th-1, y el crecimiento de las células T, las células T CD4 y las células T CD8 aumentó en todos los casos. Por lo tanto, se puede decir que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 produce una cantidad tan grande de IFN- $\gamma$  que promueve la respuesta de tipo Th1, con lo que no sólo mejora de la inmunidad general, sino también regula el desequilibrio inmunitario de Th1/Th2.

Se sabe que un aumento en las células inmunitarias generales, específicamente las células T, incluyendo células T CD4 y las células T CD-8, mejora la inmunidad para ser eficaz para prevenir o tratar una infección del tracto digestivo (intestinal), una infección urogenital, una infección respiratoria, una infección por *Helicobacter* o reacciones alérgicas (infección del tracto digestivo (intestinal); Jain S, Yadav H, Sinha PR. Probiotic dahi containing *Lactobacillus casei* protects against *Salmonella enteritidis* infection and modulates immune response in mice. *J Med Food*. Jun 2009;12(3):576-83., la infección urogenital; Zarate G, Santos V, Nader-Macias ME. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2009;2009: 48358. Epub 29 Mar. 2007, respiratory infection; Yasuda Y, Matsumura Y, Kasahara K, Ouji N, Sugiura S, Mikasa K, Kita E. Microbial exposure early in life regulates airway inflammation in mice after infection with *Streptococcus pneumoniae* with enhancement of local resistance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 25 Sep. 2009 [Epub antes de la edición impresa]; o la infección por *Helicobacter* (Boyanova L, Stephanova-Kondratenko M, Mitov I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains: preliminary report. *Lett Appl Microbiol*. Mayo de 2009;48(5):579-84. Epub 2009 9 de Mar.) y las reacciones alérgicas (Ouwehand AC, Nermes M, Collado MC, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. *World J Gastroenterol*. 14 Jul 2009;15(26):3261-8). Por lo tanto, los resultados experimentales muestran que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 es eficaz para prevenir o tratar una infección del tracto digestivo (intestinal), una infección urogenital, una infección respiratoria, una infección por *Helicobacter* o una reacción alérgica, debido a la potenciación de la inmunidad general que resulta de la activación del crecimiento de las células T.

Recientemente, se ha informado de que las células Th2 aumentan relativamente en la sangre periférica y en lesiones de la piel en pacientes con dermatitis atópica (Miraglia et. al, Immune dys-regulation in atopic dermatitis, Allergy and Asthma Proceedings, Volumen 27, Noviembre-Diciembre de 2006, páginas 451-455). Por lo tanto, un desequilibrio de Th1/Th2 causado por un exceso de respuesta Th2 induce enfermedades tales como la dermatitis atópica. Además, como se ha descrito anteriormente, el exceso de respuesta o una respuesta insuficiente de Th1 o Th2 causa un brote de enfermedades. Si la respuesta Th1 disminuye y la respuesta Th2 aumenta, se sabe que se producen cánceres, enfermedades atópicas, alergias y enfermedades autoinmunitarias (Elenkov and Chrousos, Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease, Trends in Endocrinology and Metabolism, Volumen 10, Noviembre de 1999, páginas 359-368). Por lo tanto, se espera que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 se pueda aplicar no solo a las enfermedades y las alergias atópicas, sino también a cánceres y enfermedades autoinmunitarias puesto que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 controla un desequilibrio de Th1/Th2 mediante la promoción de reacciones de tipo Th1.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición para potenciar la respuesta inmunitaria, que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP243. La composición para potenciar la respuesta inmunitaria es eficaz para reforzar la respuesta inmunitaria puesto que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 es una bacteria ácido láctica que es eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria como se ha descrito anteriormente. En particular, como se demuestra mediante los ejemplos descritos a continuación, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 es eficaz para activar el crecimiento de las células inmunitarias generales, y por lo tanto la composición para potenciar la respuesta inmunitaria es eficaz para prevenir o tratar una infección del tubo digestivo (intestinal), una infección urogenital, una infección respiratoria, una infección por *Helicobacter* y una reacción alérgica. Además, la composición para potenciar la respuesta inmunitaria es eficaz para prevenir o tratar las enfermedades causadas por un desequilibrio de Th1/Th2, ya que CJLP243 es eficaz para promover la respuesta Th1. Por lo tanto, la composición para potenciar la respuesta inmunitaria se puede utilizar con eficacia para la prevención o el tratamiento de la enfermedades atópicas, alergias, cáncer y enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen asma, fiebre del heno, y similares.

La composición para potenciar la respuesta inmunitaria se puede administrar por vía oral, pero el método de administración de la composición no está limitado. La dosis puede variar de acuerdo con el tipo de enfermedad, la inmunidad que necesita ser mejorada, el grado de gravedad, la edad, el sexo, y el origen étnico de los pacientes, y los fines del tratamiento o la prevención. En general, se pueden administrar a un adulto de 10 millones a 100 mil millones de bacterias.

La composición para prevenir o tratar enfermedades intestinales, que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP243 y la composición para potenciar la respuesta inmunitaria que comprende *Lactobacillus plantarum* CJLP243, utiliza bacterias ácido lácticas, cuya seguridad está demostrada, y de este modo las composiciones se pueden aplicar a

productos farmacéuticos, alimentos funcionales, cosméticos, alimentos para ganado, o aditivos para la alimentación del ganado, sin ninguna preocupación sobre los efectos secundarios.

5 Si la composición se utiliza como productos farmacéuticos, la composición puede formularse en formulaciones farmacéuticas que se utilizan comúnmente en la técnica. Los productos farmacéuticos pueden ser formulaciones para administración oral tales como líquidos, suspensiones, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, píldoras, o extractos.

10 Mientras se formula la composición, se pueden añadir a las formulaciones excipientes o aditivos compatibles farmacéuticamente aceptables. La formulación para administración oral puede incluir al menos uno seleccionado del grupo que consiste de un diluyente, un lubricante, un aglutinante, un disgregante, un edulcorante, un estabilizador, y un conservante, como excipiente, y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un agente aromatizante, una vitamina, y un antioxidante, como aditivo.

15 El excipiente y el aditivo pueden ser cualquier material farmacéuticamente aceptable. En particular, el diluyente puede ser ácido láctico, almidón de maíz, aceite de soja, celulosa microcristalina, o manitol, el lubricante puede ser estearato de magnesio o talco, y el aglutinante puede ser polivinilpirrolidona o hidroxipropilcelulosa. Además, los disgregantes pueden ser carboximetilcelulosa de calcio, glicolato de almidón sódico, polacrilina de potasio, o crospovidona, el edulcorante puede ser azúcar blanco, fructosa, sorbitol, o aspartamo, el estabilizador puede ser carboximetilcelulosa sódica,  $\beta$ -ciclodextrina, cera blanca, o goma de xantano, y el conservante pueden ser paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de propilo, o sorbato de potasio.

20 Además de las sustancias anteriores, se pueden añadir a la formulación un aroma natural tal como aroma de ciruela, aroma de limón, aroma de piña, o aroma de hierbas, un zumo de fruta natural, un colorante natural tal como clorofilina o flavonoide, un agente edulcorante tal como fructosa, miel, alcohol de azúcar, o azúcar, o un acidulante, tal como ácido cítrico o citrato de sodio, o combinaciones de los mismos con el fin de mejorar el sabor.

25 Este método de formulación, y los excipientes y aditivos para la formulación se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19<sup>a</sup> ed., 1995).

30 La composición se puede utilizar como alimento. El alimento puede incluir no sólo alimentos funcionales, sino también alimentos cotidianos. La composición utilizada como alimento funcional se puede formular en una variedad de formulaciones que se utilizan comúnmente en la técnica con excipientes o aditivos fisiológicamente aceptables. El alimento funcional puede ser polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, líquidos, extractos, té, jalea, bebidas, o similares. Se pueden utilizar excipientes o aditivos fisiológicamente aceptables cualesquiera que se utilizan comúnmente en la técnica.

35 Debido a su eficacia para prevenir o tratar enfermedades atópicas, la composición puede ser utilizado en cosméticos. La composición utilizada en cosméticos se puede formular en una variedad de formulaciones que se utilizan comúnmente en la técnica. Durante la preparación de las formulaciones, pueden añadirse a las mismas excipientes o aditivos que sean aceptables para los cosméticos.

La composición puede ser utilizada como alimento para animales o aditivos de alimento para animales.

45 Si la composición se utiliza como un aditivo de alimento para animales, la composición puede ser un líquido con alta concentración que oscila de 20 a 90% o se pueden preparar en forma de polvo o gránulos. El aditivo de alimento para animales puede incluir al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un ácido orgánico tal como ácido cítrico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido láctico o ácido málico, una sal fosfato tal como fosfato de sodio, fosfato de potasio, pirofosfato ácido, o polifosfato (fosfato polimerizado), y un antioxidante natural tal como polifenol, catequina,  $\alpha$ -tocoferol, extracto de romero, vitamina C, extracto de té verde, extracto de regaliz, quitosano, ácido tánico o ácido fítico. La composición utilizada como alimento para el ganado se puede formular en una variedad de formulaciones que se utilizan comúnmente en la técnica con ingredientes comúnmente utilizados en la alimentación del ganado.

50 El aditivo de alimento para animales y el alimento para animales pueden incluir cereales tales como trigo en polvo o pulverizado, avena, cebada, maíz o arroz; alimento para animales con proteína vegetal que contiene colza, habas, o girasol como ingrediente principal; alimento para animales con proteínas animales tales como sangre en polvo, carne en polvo, hueso en polvo, o pescado en polvo; azúcar; y productos lácteos tales como leche en polvo y suero de leche en polvo. El aditivo de alimento para animales y el alimento para animales pueden incluir adicionalmente suplementos de nutrientes, agentes para ayudar a la digestión y la absorción, sustancias promotoras del crecimiento, o similares.

60 El aditivo de alimento para animales solo se puede administrar a animales o se puede combinar con otro aditivo de alimento para animales en excipientes comestibles que van a ser administrados. Además, el aditivo de alimento para

animales puede administrarse como aderezo al alimento para animales o en forma de una mezcla con el alimento para animales. Alternativamente, el aditivo del alimento para animales puede ser administrado por vía oral por separado del alimento para animales como una formulación separada. Si el aditivo de alimento para animales se administra por separado del alimento para animales, se combina con excipientes comestibles farmacéuticamente aceptables para preparar una formulación de liberación inmediata o de liberación sostenida. Los soportes comestibles pueden ser sólidos o líquidos, tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, escamas de soja, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o propilenglicol. Si se utiliza un excipiente sólido, el aditivo de alimento para animales puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, trociscos o pastillas, o un aderezo no dispersado. Si se utiliza un excipiente líquido, el aditivo de alimento para animales puede estar en forma de cápsulas blandas de gelatina, una suspensión de jarabe, una emulsión, o una solución.

El alimento para animales puede incluir una harina de cereales orgánica que contiene proteína que se utiliza comúnmente para satisfacer la demanda de la dieta de los animales. La harina de cereales que contiene proteína puede incluir harina de maíz, de habas, o una mezcla de harina de maíz/habas.

Además, el aditivo de alimento para animales y el alimento para animales pueden incluir aditivos tales como un conservante, un estabilizador, un agente humectante, un emulsionante, y un agente solubilizante. El aditivo de alimento para animales puede ser añadido al alimento para animales mediante infiltración, pulverización, y mezclado.

El alimento para animales o el aditivo de alimento para animales se pueden aplicar a alimentos para animales de diversos animales tales como mamíferos, aves y peces. Los mamíferos incluyen cerdos, vacas, ovejas, cabras, roedores de experimentación, y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos). Las aves de corral incluye pollos, pavos, patos, gansos, faisanes, y codornices, y los peces incluye la trucha. Sin embargo, el ganado no está limitado por los mismos

### Efectos ventajosos de la invención

Como se describió anteriormente, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de acuerdo con la presente invención es un probiótico que tiene resistencia al ácido, resistencia a la bilis excelentes, y una fuerte adherencia a las células epiteliales intestinales, y por lo tanto es eficaz para aliviar trastornos intestinales. Además, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 es eficaz para prevenir o tratar diversas enfermedades debido a sus efectos potenciadores de la inmunidad resultantes de la promoción del crecimiento de células inmunitarias generales, incluyendo las células T. Particularmente, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 promueve la respuesta Th1 y por lo tanto es eficaz para el tratamiento de enfermedades causadas por un desequilibrio Th1/Th2 debido a la respuesta excesiva de Th2. Por lo tanto, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a una composición para el tratamiento de enfermedades intestinales y una composición para potenciar la respuesta inmunitaria.

### Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras características y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes mediante la descripción en detalle de las realizaciones ilustrativas de la misma con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La FIG. 1 es un gráfico que ilustra la resistencia al ácido de *Lactobacillus plantarum* CJLP243;

La FIG. 2 es un gráfico que ilustra la resistencia a la bilis de *Lactobacillus plantarum* CJLP243;

La FIG. 3 es un gráfico que ilustra la capacidad de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 para adherirse a las células intestinales epiteliales.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra los resultados de un ensayo MTT que se llevó a cabo en las células inmunitarias de bazo, que se aislaron a partir de ratones y se cultivan ex vivo, y después se trataron con *Lactobacillus plantarum* CJLP243, en comparación con los principales grupos de tratamiento con mitógeno, un grupo de tratamiento con  $\beta$ -glucano y un grupo de tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 5 es un gráfico que ilustra los resultados de un ensayo de IFN- $\gamma$ , que se llevó a cabo sobre células inmunitarias de bazo que se aislaron a partir de ratones y se cultivaron ex vivo, y a continuación se trataron con *Lactobacillus plantarum* CJLP243, en comparación con un grupo de tratamiento con mitógeno principal, un grupo de tratamiento con  $\beta$ -glucano y un de grupo de tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 6 es un gráfico que ilustra un peso corporal medido inmediatamente antes de sacrificar los ratones a los que se habían administrado oralmente las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 7 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la medición de un cambio en la población de células T con el fin de identificar el efecto de cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* sobre células inmunitarias en el bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado por vía oral las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 8 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la medición de un cambio en la población de células T CD4 con el fin de identificar el efecto de las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* sobre las células inmunitarias en el bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado por vía oral cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 9 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la medición de un cambio en la población de células T CD8 con el fin de identificar el efecto de las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* en las células inmunitarias en el bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado por vía oral cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 10 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la medición de la cantidad de IL-2 producida por las células T a partir de células de bazo que se obtuvieron a partir del bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado por vía oral cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* y que se habían estimulado después con ConA ex vivo, utilizando un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), con el fin de identificar el efecto de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 en la activación de las células T, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 11 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la medición de la cantidad de IFN- $\gamma$  producido por las células T a partir de células de bazo que se obtuvieron a partir del bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado oralmente cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* y que se habían estimulado después con ConA ex vivo, utilizando el método ELISA, con el fin de identificar el efecto de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 en la activación de las células T, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

## 25 Modo para la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el propósito y alcance de la invención.

### 30 Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*

Se realizaron frotis de cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* aisladas de kimchi sobre un medio MRS sólido (Difco, EE.UU.) que contenía agar al 1,5%, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las colonias que se demostró que eran puras se recogieron mediante un asa de siembra y se incubaron en un medio MRS líquido (Difco, EE.UU.) a 37°C durante 18 a 24 horas.

A continuación, se midieron las propiedades morfológicas y fisiológicas de las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* utilizando un método descrito por Kim *et. al.* (Kim *et. al.*, *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi, *International Journal of Systematic and Evolutional Microbiology*, Volumen 53, Julio de 2003, páginas 1123-1126), y utilizando kits API50CH y API50CHL (Biomerio). Las propiedades morfológicas y fisiológicas identificadas de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 se enumeran en la Tabla 1 anterior.

Además, se analizó una secuencia de bases de un gen de ARNr 16S para identificar y clasificar bacterias ácido lácticas. La determinación y el análisis de la secuencia de bases del gen de ARNr 16S se llevaron a cabo utilizando un método descrito por Kim *et. al.* (Kim *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. Como resultado, la secuencia de bases del gen de ARNr 16S de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 se muestra en el SEC ID NO: 1 en la lista de secuencias adjunta.

Como resultado de un análisis de la secuencia de bases de ARNr 16S, una cepa CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* tenía la homología más alta (99,9%) con una cepa convencional de *Lactobacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum* NBRC15891<sup>T</sup>, Número de acceso GenBank AB326351), y se identificó, se nombró *Lactobacillus plantarum* CJLP243, y depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el 14 de Octubre de 2009 (Núm. de depósito: KCCM11045P).

Ejemplo 2: Ensayo de resistencia al ácido en el ensayo de resistencia al jugo gástrico y a la bilis artificial en bilis artificial para las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*

Se llevó a cabo un ensayo de resistencia al ácido en un jugo gástrico artificial utilizando un jugo gástrico artificial preparado utilizando un método modificado referido por Kobayashi *et. al.*, (Kobayashi *et. al.*, *Studies on biological characteristics of Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Japan Journal of Microbiology*. Volumen 29, Julio de 1974, páginas 691-697). En particular, el jugo gástrico artificial se preparó ajustando el pH de un medio MRS líquido a 2,5 utilizando HCl, añadiendo pepsina a una concentración de 1.000 unidades/mL, y esterilizando el medio.

Las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* aisladas e identificadas en el Ejemplo 1 e incubadas en un medio MRS líquido a 37°C durante 18 horas se centrifugaron para precipitar las cepas, y se lavaron dos veces con solución salina esterilizada (NaCl al 0,85%). A continuación, la suspensión de las cepas se inoculó en un medio de control y el jugo gástrico artificial a una concentración de aproximadamente  $10^7$  ufc/mL. Se midió el número de cepas que sobrevivieron al principio de la inoculación y después de 3 horas de la inoculación mientras se cultivaban a 37°C, en donde el número total de cepas se midió diluyendo las cepas 10 veces con una solución tamponada con fosfato (pH 6,8) que contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , L-cisteína, HCl, Tween 80, y similares.

Se llevó a cabo un ensayo de resistencia a la bilis en bilis artificial de acuerdo con un método descrito por Casey *et. al.* (Casey *et. al.*, Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract, Letters in Applied Microbiology. Volumen 39, 2004, páginas 431-438). El *Lactobacillus plantarum* CJLP243 se incubó en el medio que se preparó mediante la adición de bilis al 0,3% de un toro al medio MRS líquido utilizado en el ensayo de resistencia al ácido anteriormente. Las cepas se inocularon de la misma manera que en el ensayo de resistencia al ácido anterior, y se midió el número de cepas que sobrevivían al principio de la inoculación y después de 12 y 24 horas de la inoculación.

El ensayo de resistencia al ácido y el ensayo de resistencia a la bilis de *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) se llevaron a cabo de la misma manera que en los ensayos de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 para la comparación.

Los resultados se muestran en las FIG. 1. y 2. La FIG. 1 es un gráfico que ilustra la resistencia al ácido de *Lactobacillus plantarum* CJLP243. La FIG. 2 es un gráfico que ilustra la resistencia a la bilis de *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

De acuerdo con las FIG. 1 y 2, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 tenía resistencia al ácido y resistencia a la bilis igual o mayor en comparación con otras bacterias ácido lácticas. Esto indica que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de acuerdo con la presente invención puede alcanzar los intestinos sin ser afectado por el jugo gástrico y habitar en los intestinos sin ser afectado por la bilis.

Ejemplo 3: Adherencia de cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* a células epiteliales del intestino

Se obtuvo HT-29 del Banco de Líneas Celulares de Corea (KCLB) como célula animal para someter a ensayo la adherencia a las células epiteliales intestinales, y se llevó a cabo el ensayo usando los métodos referidos por Kim *et. al.* (Kim *et. al.*, Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract, Applied Microbiology and Biotechnology, Volumen 74, Abril de 2007, páginas 1103-1111) y por Hirano *et. al.* (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).

Las células HT-29 se cultivaron en un medio RPMI 1640 (Gibco, EE.UU.) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10% inactivado por calor, L-glutamina al 1%, penicilina G (100 UI/mL) y estreptomycin (100 mg/mL) en presencia de  $\text{CO}_2$  al 5% a 37°C. Con el fin de medir la capacidad de adherencia y la capacidad inhibidora de la adherencia, las células HT-29 se dividieron en una placa de 24 pocillos de tal manera que el número de células HT-29 por pocillo fue de  $1,0 \times 10^5$  células/mL. Las células HT-29 se cultivaron mientras se alteraban los medios de cultivo cada dos días hasta que se formó completamente una monocapa. La monocapa de células HT-29 completamente formada se lavó cinco veces con solución de tampón PBS a 25°C, y se añadieron 0,5 mL de un medio RPMI 1640 sin antibióticos a la misma.

Se suspendió *Lactobacillus plantarum* CJLP243 en un medio RPMI a una concentración de aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  ufc/mL, y la suspensión se inoculó en la placa de 24 pocillos preparada anteriormente y se incubó en presencia de  $\text{CO}_2$  al 5% a 37°C durante 2 horas. Cuando se completó la incubación, la placa de 24 pocillos se lavó tres veces con la solución de tampón PBS mientras se agitaba a 200 rpm durante 3 minutos con el fin de eliminar cepas que no se adhieren a la placa de pocillos y para identificar las cepas que tienen una capacidad para adherirse a la célula durante el lavado. Después del lavado, se añadió a los pocillos tripsina-EDTA al 0,2% para aislar las células adheridas. Las células aisladas se diluyeron en agua peptonada por medio de un método de dilución seriada y se aplicaron mediante frotis a una placa de agar MRS y, a continuación se cultivaron a 37°C durante 24 horas. Después del cultivo, se contó el número de cepas.

Por separado, con el fin de determinar la adherencia parcial, después de fijar un cubreobjetos de vidrio completamente esterilizado por inmersión en alcohol del 70% durante un día estaba unido a la parte inferior de una placa de Petri e incubar las células HT-29, se añadió a esto la misma cantidad de bacterias ácido lácticas que se había utilizado anteriormente, y después se cultivó y se lavó de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Las bacterias ácido lácticas que no se lavaron y se adhirieron a las células HT-29 se secaron y se tiñeron utilizando la tinción de Gram. Las bacterias teñidas se observaron utilizando un microscopio óptico y se midió el número de cepas. Se llevaron a cabo los mismos experimentos utilizando *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033).

Los resultados se muestran en la FIG. 3. La FIG. 3 es un gráfico que ilustra una capacidad de adherencia de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 a células epiteliales del intestino.

5 Haciendo referencia a la FIG. 3, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 tenía una mayor capacidad de adherencia a las células epiteliales intestinales después de 24 horas en comparación con *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) comercialmente bien conocida como probiótico. De acuerdo con estos resultados, puede observarse que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de acuerdo con un aspecto de la presente invención es capaz de adherirse a las células epiteliales intestinales, mejorando así los entornos intestinales.

10 Ejemplo 4: Ensayo de seguridad de las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*

Con el fin de evaluar la seguridad de las cepas aisladas en el Ejemplo 1, se llevaron a cabo una prueba de hemólisis, una prueba de licuefacción de la gelatina, una prueba de formación de metabolitos peligrosos (amoníaco), y una prueba de fenilalanina desaminasa de acuerdo con los métodos de prueba de seguridad sugeridas por una norma colectiva de la Korean Bio Venture Association.

Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

[Tabla 2]

Seguridad de <i>Lactobacillus plantarum</i> CJLP243				
Cepas	Prueba			
	prueba de licuefacción de la gelatina	prueba de fenilalanina desaminasa	prueba de hemólisis	prueba de formación de amoníaco
CJLP243	negativo	negativo	α-hemólisis, seguro	negativo

De acuerdo con los resultados, *Lactobacillus plantarum* CJLP243 fue negativo para la prueba de licuefacción de la gelatina, la prueba de formación de metabolitos peligrosos (amoníaco), y la prueba de fenilalanina desaminasa, y mostró α-hemólisis que se estima no estaba relacionada con un patógeno. De este modo, se comprobó que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 se puede administrar de forma segura para el cuerpo humano.

Ejemplo 5: Crecimiento de las células inmunitarias de ratón a modo de experimento ex vivo

30 Con el fin de identificar la capacidad potenciadora inmunológica de *Lactobacillus plantarum* CJLP 243, se identificó el crecimiento de las células inmunitarias de ratón mediante un ensayo MTT. El ensayo MTT se realizó como sigue de acuerdo con las instrucciones del fabricante de un kit de ensayo MTT (Promega, número de cat. G5430). En primer lugar, se diluyeron las células inmunitarias obtenidas mediante la eliminación de células de la sangre de esplenocitos de un ratón B6 en un medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%. Después, las células inmunitarias se sembraron en la placa de 96 pocillos en la cantidad de  $1 \times 10^6$  células/pocillo (volumen total de 200  $\mu$ l). Después de que se completó la siembra de las células inmunitarias, se añadieron a cada pocillo *Lactobacillus plantarum* CJLP 243 vivos ( $5 \times 10^6$  células) y se cultivaron a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 días. Después de 3 días, se retiraron 100  $\mu$ l de medio 1 hora antes del ensayo MTT con el fin de prepararse para el ensayo MTT. A continuación, se dispensaron a cada pocillo 20  $\mu$ l de solución de MTT (2 mg/mL), y después se cultivó a 37°C durante 1 hora. Después, se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de ELISA (Molecular Device, EE.UU.). Este procedimiento se repitió al menos 3 veces. En este procedimiento, en los grupos de control positivo, cada uno a una concentración de 10 mg/mL, se utilizaron concanavalina A (Con A; Número de cat. Sigma L6397), fitohemaglutamina (PHA; número de cat Sigma L8902), o lipopolisacárido (LPS; Número de cat. Sigma L4516), que son los principales mitógenos. Por otra parte, se adquirió β-glucano puro al 99% de Sigma Chemical (número de cat G5011, EE.UU.) y se utilizó a la concentración final de 1,25 g/mL para comparar la capacidad de potenciación inmunológica. Los resultados se muestran en la figura. 4.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo MTT que se realizó sobre las células inmunitarias de bazo, que se aislaron de un ratón y se cultivaron ex vivo, y después se trató con *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

50 Haciendo referencia a la FIG. 4, se puede decir que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 tiene capacidad superior para activar el crecimiento de los esplenocitos en comparación con los principales mitógenos, β-glucano, y *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033), y por lo tanto se confirma que es capaz de inducir la potenciación de la inmunidad.

Ejemplo 6: Capacidad de producir IFN-γ utilizando el análisis de citoquinas

55 Con el fin de identificar una capacidad de potenciar el sistema inmunitario de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 en

un antígeno foráneo, se midió la capacidad de producción de IFN- $\gamma$ , una citoquina de tipo Th1, utilizando un ensayo ELISA. En primer lugar, se diluyeron las células inmunitarias obtenidas mediante la eliminación de células de la sangre a partir de esplenocitos de un ratón B6 en un medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%. Después, las células inmunitarias se sembraron en la placa de 96 pocillos en la cantidad de  $1 \times 10^6$  células/pocillo (volumen total de  $200 \mu\text{l}$ ). Después de que se completó la siembra de las células inmunitarias, se añadieron a cada pocillo *Lactobacillus plantarum* CJLP 243 vivas ( $5 \times 10^5$  células) y se cultivaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5% durante 3 días. Después de 3 días, se retiraron  $50 \mu\text{l}$  del medio de cultivo y se midió la cantidad de IFN- $\gamma$  contenida en el mismo utilizando el ensayo ELISA. Para llevar a cabo el ensayo ELISA, una placa de ELISA se revistió con un anticuerpo IFN- $\gamma$  a temperatura ambiente durante 4 horas, y a continuación se añadieron a la misma  $50 \mu\text{l}$  del medio de cultivo y se cultivaron a temperatura ambiente. Después, el medio de cultivo se eliminó de la placa de ELISA, que después se recubrió con un anticuerpo para IFN- $\gamma$  biotinilado (BD Bioscience, número de cat. 554410), que es un segundo anticuerpo, a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. La reacción de color se indujo mediante estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (Vectore, número de cat. SA-5004) y su sustrato, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, KPL, número de cat. 50-76-03). Después de llevar a cabo la reacción de color, se añadieron  $100 \mu\text{g/mL}$  de solución de parada (HCl3M) a la placa con el fin de detener la reacción de color. En este momento, la reacción de color mostró el cambio de color de azul a amarillo, y la absorbancia se midió a  $450 \text{ nm}$  utilizando un lector de ELISA (Molecular Device, EE.UU.) después de que se detuvo la reacción de color. Este procedimiento se repitió al menos 3 veces. En estos procedimientos, en los grupos positivos de control se utilizaron concanavalina A (Con A; número de cat. Sigma L6397), fitohemaglutamina (PHA; número de cat. Sigma L8902), o lipopolisacárido (LPS; número de cat. Sigma L4516), que son los principales mitógenos, cada uno a la concentración de  $10 \mu\text{g/mL}$ . Adicionalmente, se adquirió  $\beta$ -glucano al 99% puro de Sigma Chemical (número de cat. G5011, EE.UU.) y se utilizó en una cantidad de  $1,25 \text{ mg}$  al final para comparar la capacidad de potenciación inmunológica. Los resultados se muestran en la FIG. 5.

La FIG. 5 es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo de IFN- $\gamma$  que se realizó sobre las células inmunitarias del bazo que se aislaron de ratón y se cultivaron *ex vivo*, y después se trataron con *Lactobacillus plantarum* CJLP243.

Haciendo referencia a la figura. 5, se puede decir que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 tiene capacidad inferior a los principales mitógenos que son grupos de control positivo, pero capacidad significativamente superior a *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033) con respecto a la producción de IFN- $\gamma$ , y por lo tanto se confirma que es capaz de inducir la inmunidad de tipo Th1 potenciada.

Ejemplo 7: Inmunidad potenciada de la cepa CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* cuando se administra por vía oral

Se llevó a cabo como un ensayo para la identificación de la potenciación de la inmunidad de una cepa CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* cuando se administra por vía oral de la siguiente manera.

Se adquirieron ratones Balb/c hembras de 4 semanas de edad, y se mantuvieron para la estabilización durante 1 semana en una sala de cría de animales, que estaba en la condición SPF mantenida a una temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y una humedad de  $55 \pm 15\%$ . A los ratones se les proporcionó alimento general en polvo para animales a lo que se añadieron algunos antibióticos, y se les proporcionó agua *ad libitum*. Cada *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus plantarum* CJLP 243 se procesó en forma de polvo liofilizado, que se mantuvo refrigerado. Las bacterias ácido lácticas se mezclaron uniformemente con el alimento en polvo para animales y se administraron oralmente a los ratones a una dosis de  $2,5 \times 10^{10}$  UFC/día/ratón. El peso de cada ratón se midió durante 8 semanas durante la administración, y a continuación todos los ratones fueron sacrificados para los siguientes experimentos.

Se retiró el bazo de cada ratón sacrificado, y se midieron su longitud y su peso. El bazo fue aplastado utilizando un émbolo de una jeringa y se filtró a través de una malla con el fin de separar las células, y estos procedimientos se llevaron a cabo en un tampón ACK. Las células separadas se contaron utilizando un microscopio.

Con el fin de identificar el cambio en la composición de células inmunitarias en los esplenocitos separados, las células T en las células separadas se tiñeron con anticuerpos anti-Thy1.2-FITC, y las células B se tiñeron con anticuerpos anti-CD 19-FITC. Las células T CD se tiñeron con anticuerpos anti-Thy1.2-FITC y anticuerpos anti-CD4-PE, y las células CD8 se tiñeron con anticuerpos anti-Thy1.2-FITC y anticuerpos anti-CD8-PE. Se analizaron las células teñidas en cada tejido para determinar su proporción de composición utilizando un FACScan (BD Biosciences, EE.UU.).

Los esplenocitos separados se trataron con ConA a una concentración de  $5 \mu\text{g/mL}$  para estimular los linfocitos T. Después de 24 horas, se retiró el sobrenadante y se midieron las concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-2, citoquinas de los linfocitos T, utilizando un ELISA. Una microplaca se recubrió con IFN- $\gamma$  y anticuerpos de captura para IL-2 a  $4^\circ\text{C}$  durante la noche, y después se lavó con PBS (PBST) que contenía Tween 20 al 0,05% y se bloqueó con PBS que contenía suero bovino fetal al 3%. Después de 1 hora, la microplaca se lavó y se añadieron a cada pocillo el sobrenadante y una solución convencional (una solución convencional proporcionada por BD Bioscience) y se

hicieron reaccionar a 4°C durante la noche. A continuación, la microplaca se lavó y se añadieron anticuerpos biotinilados a cada pocillo, y la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después, la microplaca se lavó y se añadió a cada pocillo estreptavidina-fosfatasa alcalina, y el cultivo se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar la microplaca, se llevó a cabo una reacción de color mediante la adición de una solución de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma, EE.UU.) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplaca, y la concentración de citoquinas se midió utilizando una curva patrón.

Los resultados se muestran en las FIG. 6 a 11.

La FIG. 6 es un gráfico que ilustra el peso medido inmediatamente antes de sacrificar los ratones a los que se habían administrado oralmente las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Haciendo referencia a la figura. 6, se observó que el grupo al que se habían administrado las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* mantenía el peso corporal normal sin anomalías debido a la potenciación excesiva de la inmunidad, y no se observaron anomalías con respecto al peso del bazo y al número de células (no se muestran los datos).

La FIG. 7 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos midiendo el cambio en una población de células T con el fin de identificar el efecto de las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* sobre las células inmunitarias en el bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado por vía oral las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 8 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos midiendo el cambio en una población de células T CD4 con el fin de identificar el efecto de las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* sobre las células inmunitarias en el bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado por vía oral las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 9 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos midiendo del cambio en una población de células T CD8 con el fin de identificar el efecto de las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* sobre las células inmunitarias en el bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado por vía oral las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum*, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Haciendo referencia a las FIG. 7, 8 y 9, se identifica que las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* aumentan el número de células T, células T CD4, y células T CD8, y por lo tanto se puede decir que *Lactobacillus plantarum* CJLP243 potencia la inmunidad al afectar a la activación del crecimiento de células T.

Además, con el fin de identificar el efecto de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 sobre la activación de células T, se midió la cantidad de IL-2 e IFN- $\gamma$  producida por las células T a partir de células de bazo que se obtuvieron a partir del bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado oralmente las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* y que después se habían estimulado con ConA ex vivo, utilizando el método ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en las FIG. 10 y 11.

La FIG. 10 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de IL-2 producida por las células T de células de bazo que se obtuvieron a partir del bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado oralmente las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* y que después se habían estimulado con ConA ex vivo, utilizando el método ELISA, con el fin de identificar el efecto de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 en la activación de las células T, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La FIG. 11 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos midiendo la cantidad de IFN- $\gamma$  producida por las células T de células de bazo que se obtuvieron a partir del bazo aislado después de sacrificar los ratones a los que se habían administrado oralmente las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* y que después se habían estimulado con ConA ex vivo, utilizando el método ELISA, con el fin de identificar el efecto de *Lactobacillus plantarum* CJLP243 en la activación de las células T, en comparación con un grupo de control negativo y un grupo al que se había administrado *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Haciendo referencia a las FIG. 10 y 11, se puede decir que se identifica que las cepas CJLP243 de *Lactobacillus plantarum* aumentan la producción de citoquinas de células T por encima del grupo de control negativo, por lo cual *Lactobacillus plantarum* CJLP243 puede inducir la activación de células T y potenciar la inmunidad general.

Ejemplo 8: Preparación de probióticos en polvo que comprenden *Lactobacillus plantarum* CJLP243

5 Los *Lactobacillus plantarum* CJLP243 identificados en el Ejemplo 1 fueron producidos en masa y liofilizados para preparar probióticos que aplicarlos a las materias primas para productos farmacéuticos, alimentos, alimentos para animales, aditivos de alimento para animales, o cosméticos.

10 Las bacterias se incubaron en un medio MRS líquido (Difco) a 37°C durante 18 horas mientras se regulaba el pH a 6,0 utilizando una solución de NaOH al 25%, y se centrifugaron para obtener las cepas. Las cepas recogidas se liofilizaron a -40°C utilizando dextrina al 5% y leche desnatada al 10% como agentes de protección de la liofilización, y de las cepas secas se pulverizaron utilizando un mezclador a 37°C para preparar polvo. Las bacterias vivas en polvo se mezclaron con excipientes, tales como glucosa, ácido láctico, y leche desnatada, para ajustar el número de bacterias a un nivel deseado y para almacenar las bacterias vivas, y se envasaron en una bolsa de aluminio sellada.

15 Los probióticos preparados de acuerdo con este método se pueden aplicar a productos farmacéuticos, pienso, alimento para animales, cosméticos, o similares, mezclándolos con el polvo de cereales utilizado como materia prima del alimento para animales, mezclándolos con excipientes o aditivos para formar productos farmacéuticos, tales como comprimidos y cápsulas, o pienso, y mezclándolos con las materias primas para formar cosméticos.

20 <110> CJ Cheiljedang Corporación  
<120> Lactobacillus plantarum novedoso y composiciones que lo comprenden  
<130> pn085815  
<160> 1  
<170> KopatentIn 1.71  
<210> 1  
25 <211> 1461  
<212> ADN  
<213> Lactobacillus plantarum  
<400> 1

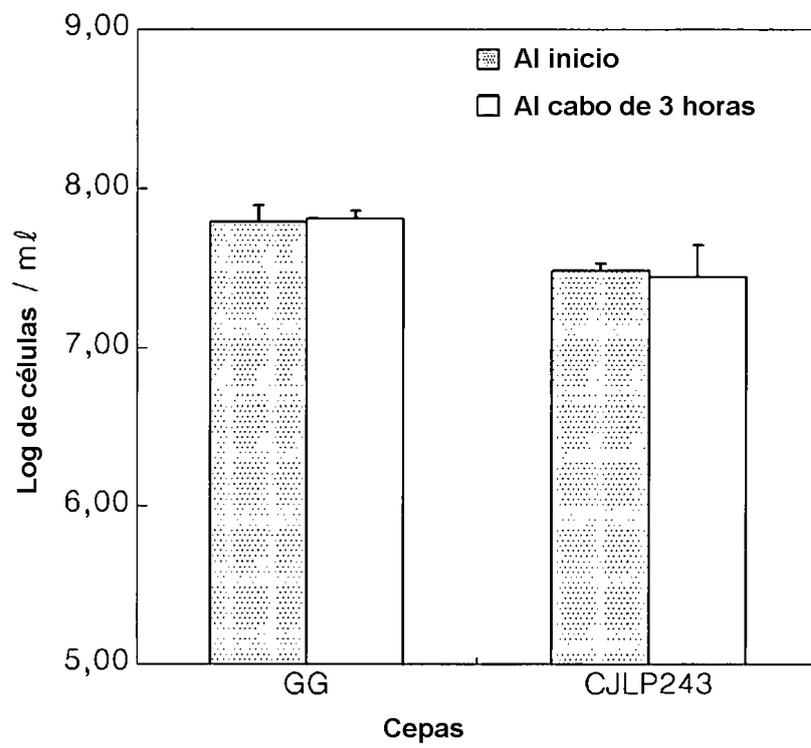
ES 2 582 828 T3

agtcgaacga actctggtat tgattggtgc ttgcatcatg atttacattt gagtgagtgg	60
cgaactggtg agtaacacgt gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca	120
gatgctaata ccgcataaca acttggaccg catggtccga gcttgaaaga tggcttcggc	180
tatcactttt ggtggtccc gcggcgattt agctagatgg tgggtaacg gctcaccatg	240
gcaatgatac gtagccgacc tgagagggta atcggccaca ttgggactga gacacggccc	300
aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc	360
aacgccgctg gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctgttgtaa agaagaacat	420
atctgagagt aactgttcag gtattgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg	480
tgccaacagc cgcgtaata cgtaggtggc aagcgttgc cggatttatt gggcgtaaag	540
cgagcgcagg cgtttttta aatctgatgt gaaagccttc ggctcaaccg aagaagtgca	600
tcggaaactg ggaaacttga gtgcagaaaa agacaatgga actccatgtg tagcggtgaa	660
aatgcgtaat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggtct gtaactgacg	720
ctgaggctcg aaagtatggg tagcaaacag gattagatac cctggtagtc cataccgtaa	780
acgatgaatg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag	840
cattccgctt ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc	900
acaagcggtg gagcatgttg ttaattcga agctacgca agaaccttac caggtcttga	960
catactatgc aaatctaaga gattagacgt tcccttcggg gacatggata caggtggtgc	1020
atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggtaag tcccgcaacg agcgcaaccc	1080
ttattatcag ttgccagcat taagttgggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg	1140
aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtgct	1200
acaatggatg gtacaacgag ttgcgaaact gcgagagtaa gctaactctt taaagccatt	1260
ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagt cggaatcgct agtaatcgcg	1320
gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcacaccatg	1380
agagtttgta acacccaaag tcgggtgggt aaccttttag gaaccagccg cctaaggtgg	1440
gacagatgat tagggtgaag t	1461

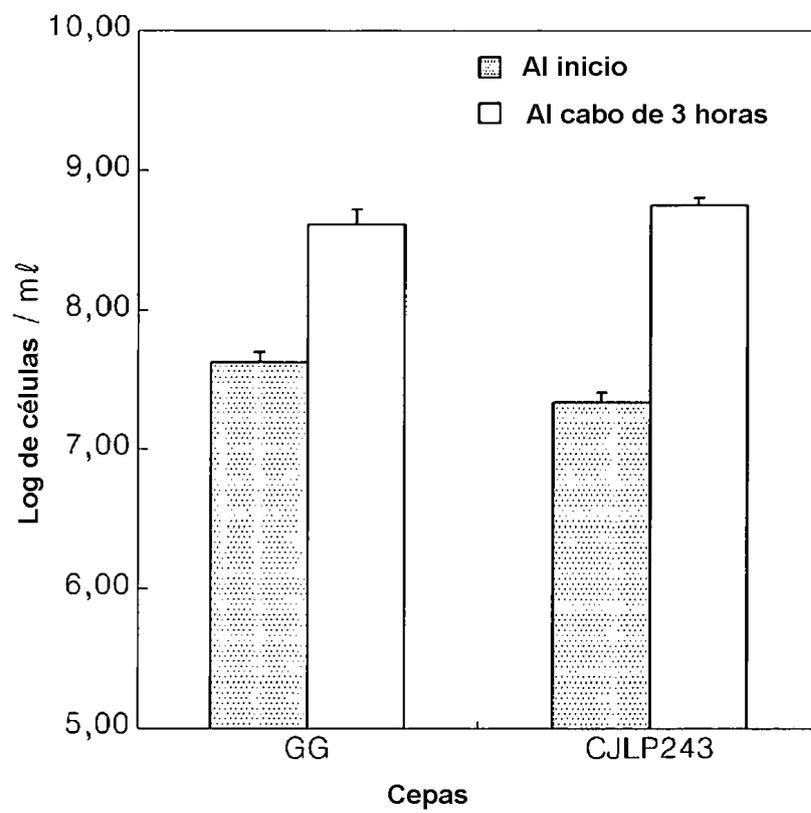
**REIVINDICACIONES**

1. El *Lactobacillus plantarum* CJLP243 depositado bajo el número KCCM 11045P.
- 5 2. Una composición para su uso en un método de tratamiento para la prevención o tratamiento de enfermedades intestinales que comprende el *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de la reivindicación 1.
3. Una composición para su uso en un método de tratamiento para potenciar la respuesta inmunitaria que comprende el *Lactobacillus plantarum* CJLP243 de la reivindicación 1.
- 10 4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde la composición se utiliza para prevenir o tratar una enfermedad inmunológica seleccionado del grupo que consiste en infección del tracto digestivo (intestinal), infección respiratoria, infección por *Helicobacter* y reacción alérgica.
- 15 5. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde la composición se utiliza para prevenir o tratar una enfermedad inmunológica causada por un desequilibrio de Th1/Th2 debido a una respuesta excesiva de Th2.
6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en donde la enfermedad inmunológica se selecciona del grupo que consiste en enfermedades alérgicas, enfermedades atópicas, cáncer y enfermedades autoinmunitarias.
- 20 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la composición es un producto farmacéutico.
- 25 8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la composición es un alimento funcional.
9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la composición es alimento para animales o aditivos de alimento para animales.
- 30 10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la composición es un cosmético.

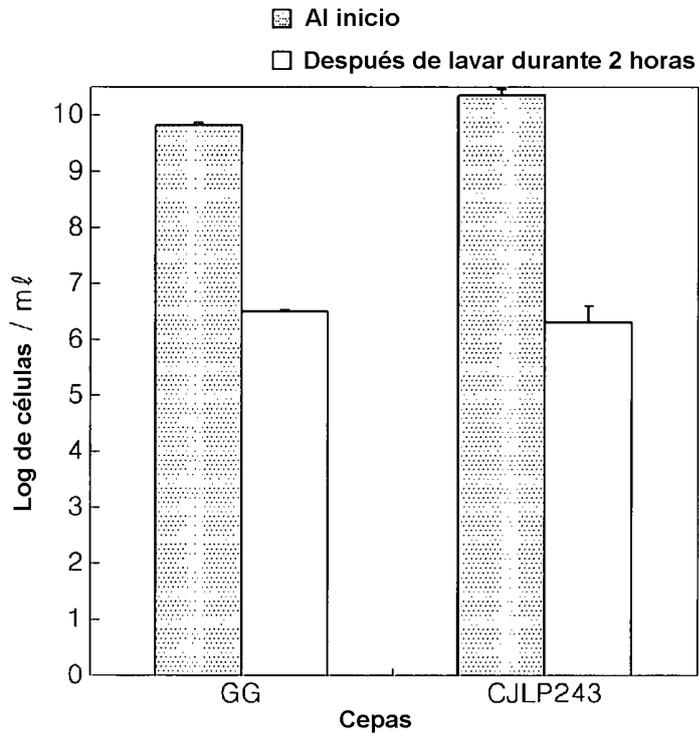
[Fig. 1]



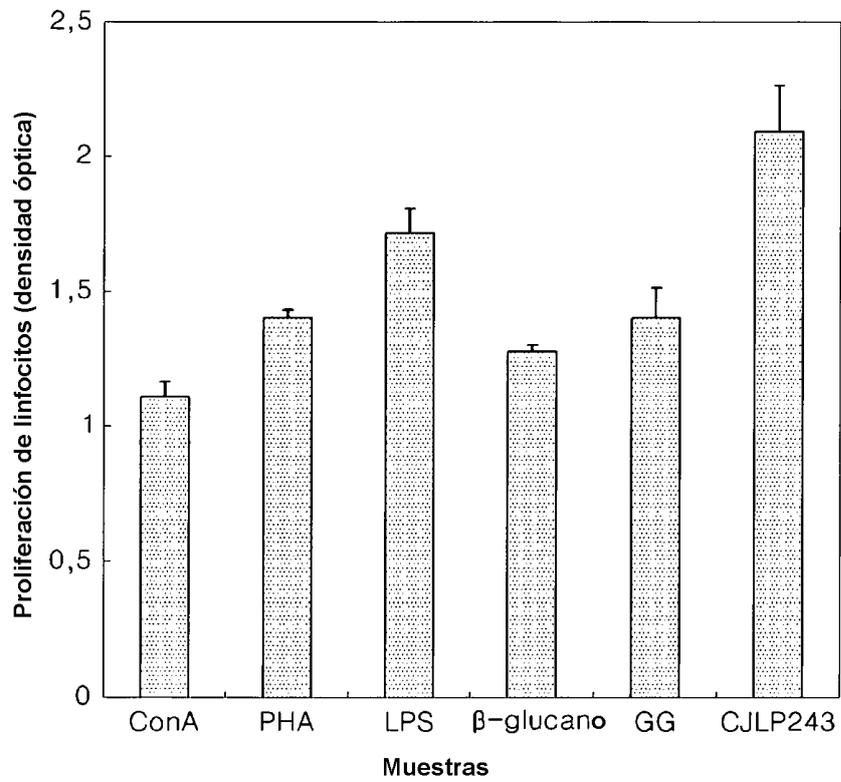
[Fig. 2]



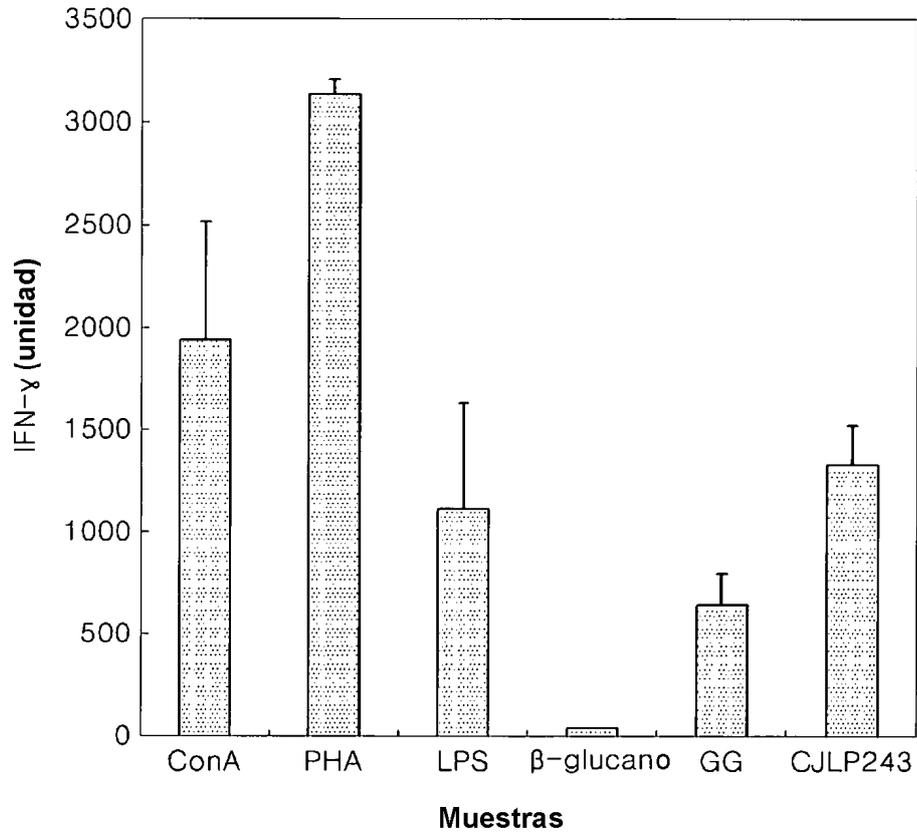
[Fig. 3]



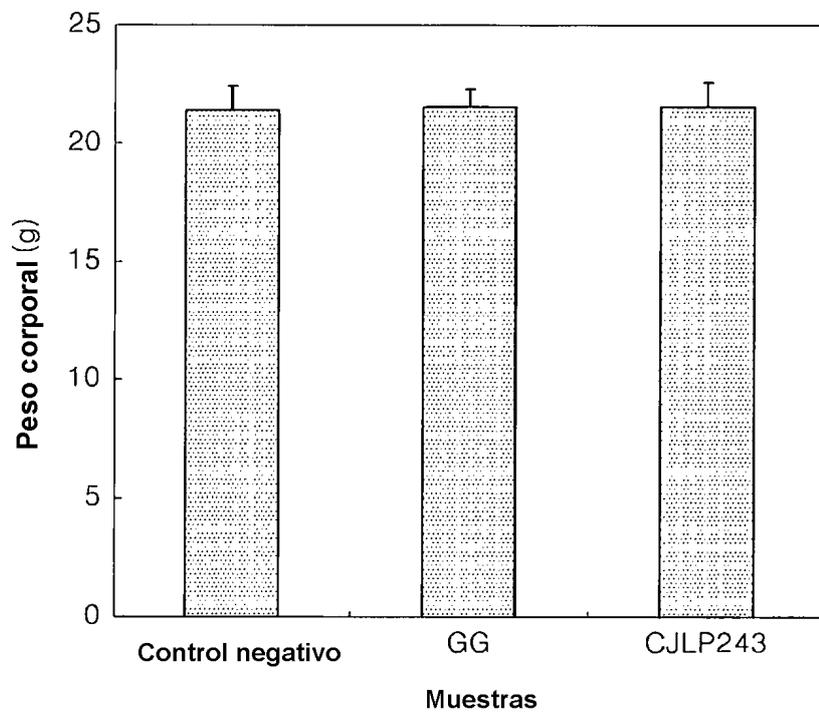
[Fig. 4]



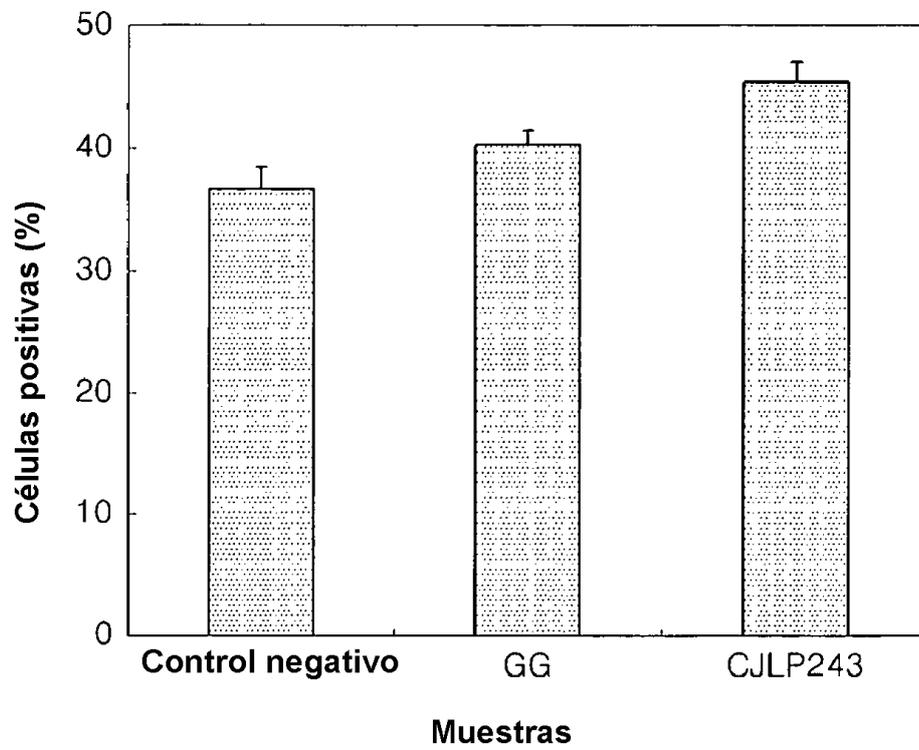
[Fig. 5]



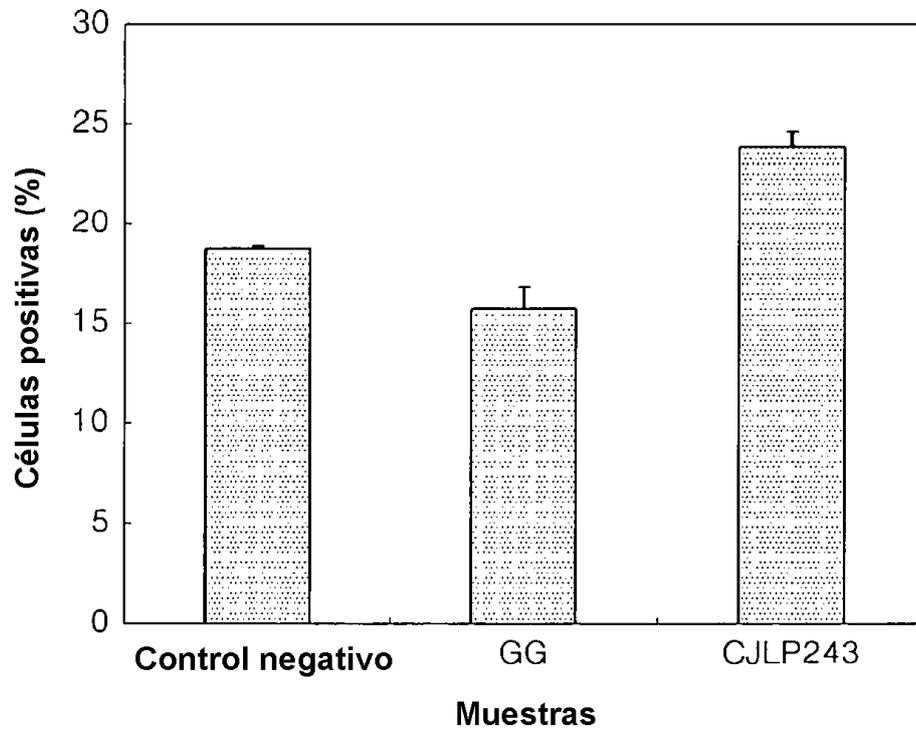
[Fig. 6]



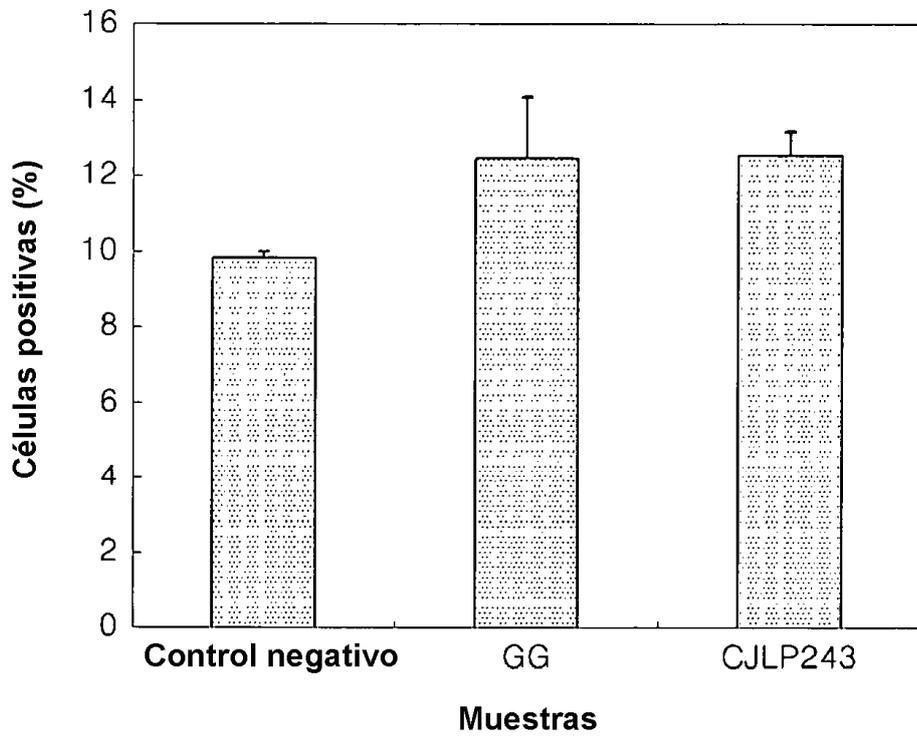
[Fig. 7]



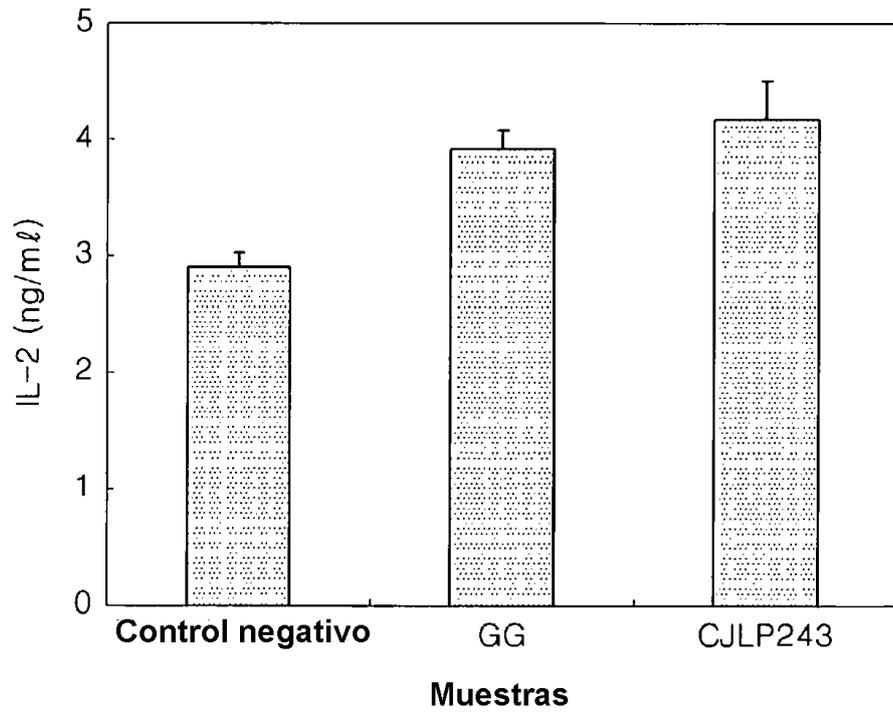
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

