

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 082**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 36/06 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2014 PCT/JP2014/054233**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14129599**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014 E 14754913 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2960327**

54 Título: **Leuconostoc mesenteroides como agente inmunoestimulador**

30 Prioridad:

22.02.2013 JP 2013033072

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2018

73 Titular/es:

**NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
(100.0%)
35-3 Minamibiraki, Kamiueno-cho
Muko-shi, Kyoto 617-0006, JP**

72 Inventor/es:

**YAMAMOTO, KENJI;
MATSUZAKI, CHIAKI y
HISA, KEIKO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 658 082 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

Leuconostoc mesenteroides como agente inmunoestimulador

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un lactobacilo recientemente aislado que pertenece al género Leuconostoc, un agente inmunoestimulador, particularmente un agente inmunoestimulador intestinal, que comprende el lactobacilo o una bacteria procesada del mismo, y similares. Más particularmente, la presente invención se refiere a la cepa Leuconostoc mesenteroides NTM048 depositada con el número de entrada NITE BP-1519 o a una bacteria procesada de la misma, que tiene una capacidad promotora de la producción de IgA, y similares.

Antecedentes de la invención

10 El órgano inmune intestinal se denomina genéricamente tejido linfático asociado al intestino (GALT) y está constituido principalmente por el parche de Peyer, el ganglio linfático mesentérico y el epitelio intestinal. Las sustancias extrañas (antígenos) tales como patógenos y similares que invaden el intestino se incorporan a las células M del parche de Peyer, y se presentan a las células T mediante células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas y similares presentes en el parche de Peyer. Simultáneamente, las células B también reconocen el antígeno y el cambio de clase de las células B IgM⁺ a las células B IgA⁺ se produce por la estimulación con citoquinas para finalmente convertirse en células plasmáticas que secretan inmunoglobulina A (de aquí en adelante en este documento denominada "IgA").

20 El número de células productoras de IgA específicas del intestino es de aproximadamente 70-80% de las células plasmáticas presentes en todo el cuerpo, y la IgA secretada por las células plasmáticas proporciona defensa frente a infecciones tales como inhibición de la unión de patógenos a las células epiteliales de la mucosa, neutralización de toxinas y enzimas producidas a partir de patógenos por la unión de IgA a las mismas y similares. Por lo tanto, es muy importante activar la inmunidad intestinal mediante la producción de IgA para mantener el equilibrio de la inmunidad.

25 En los últimos años, el número de pacientes que padecen enfermedades alérgicas está aumentando rápidamente. Tales pacientes tienden a mostrar una disminución en la inmunidad de la mucosa intestinal y, por lo tanto, se considera que la potenciación (el desarrollo) de la inmunidad de la mucosa intestinal conduce a la profilaxis de la misma.

30 Como bacterias que tienen una capacidad de promoción de la producción de IgA y capaces de potenciar la inmunidad intestinal, se han mostrado la cepa AYA de Lactobacillus plantarum (documento de patente 1), cepa de Lactobacillus gasseri (documento de patente 2) y similares.

35 El Lactobacillus se aísla de varias plantas, tales como vegetales crudos, encurtidos y similares, y se agrega a los alimentos, bebidas y similares como un probiótico. Sin embargo, dado que las publicaciones sobre lactobacilos, que tienen una capacidad de promoción de la producción de IgA y que son capaces de activar la inmunidad intestinal, están limitados a los documentos mencionados anteriormente y similares, se ha deseado la provisión de un nuevo lactobacilo que tenga una alta capacidad de promoción de la producción de IgA.

Lista de documentos

Documentos de patentes

documento de patente 1: JP-A-2008-201708

documento de patente 2: JP-A-2010-130954

40 Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

Un objetivo de la presente invención es aislar un nuevo lactobacilo que tiene una capacidad de promoción de la producción de IgA, y proporcionar un agente inmunoestimulador intestinal que contiene la cepa o una bacteria procesada de la misma y similares.

45 Medios para resolver los problemas

50 Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos en vista del problema mencionado anteriormente y han encontrado una cepa (NTM048) superior en la capacidad promotora de la producción de IgA entre aproximadamente 200 cepas de lactobacilos aisladas de diversas verduras crudas y encurtidos, y han identificado que la cepa es un lactobacilo nuevo que pertenece al género Leuconostoc. Además, los presentes inventores han descubierto que el número de células T auxiliares en el bazo aumenta mediante la administración de la cepa, y han confirmado que la cepa también proporciona no solo inmunidad intestinal sino también un efecto estimulante del

sistema inmune sistémico, que dio como resultado la conclusión de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NTM048, depositada con el número de entrada NITE BP-1519, o una cepa mutante de la misma o una bacteria procesada de la misma.

5 [2] Una preparación de lactobacilo que comprende la cepa según [1] o una bacteria procesada de la misma.

[3] La preparación de acuerdo con [2], que comprende además otros lactobacilos o una bacteria procesada de los mismos, y/o un microorganismo distinto de lactobacilo o una bacteria procesada de los mismos.

10 [4] La preparación de acuerdo con [3], en la que el otro lactobacilo es al menos un tipo seleccionado entre la bacteria *Lactobacillus*, la bacteria *Streptococcus*, la bacteria *Leuconostoc*, la bacteria *Pediococcus*, la bacteria *Lactococcus*, la bacteria *Enterococcus* y la bacteria *Bifidobacterium*.

[5] La preparación de acuerdo con [3] o [4], en la que el microorganismo distinto de lactobacilo es al menos un tipo seleccionado de levadura, bacterias *Bacillus*, bacterias de ácido butírico (*Clostridium butyricum*) y hongos.

[6] Un producto farmacéutico representado por la preparación de lactobacilo como se define en cualquiera de [2] a [5].

15 [7] La preparación tal como se define en cualquiera de [2] a [5] para su uso como inmunoestimulador.

[8] La preparación para su uso de acuerdo con [7] como inmunoestimulador intestinal.

[9] La preparación, tal como se define en cualquiera de [2] a [5], para su uso en la profilaxis o la mejora de una enfermedad relacionada con la inmunidad intestinal.

20 [10] La preparación para su uso de acuerdo con [9], en la que la enfermedad relacionada con la inmunidad intestinal se selecciona del grupo que consiste en enfermedades alérgicas, infecciones, enfermedades inflamatorias del intestino y enfermedades autoinmunes.

[11] Un alimento o un aditivo alimentario representado por la preparación de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [5].

25 [12] Un alimento o un aditivo para piensos representado por la preparación de acuerdo con uno cualquiera de [2] a [5].

[13] Un agente inmunoestimulador representado por la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 depositada con el número de entrada NITE BP-1519, o una cepa mutante del mismo o una bacteria procesada del mismo.

[14] La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 depositada con el número de entrada NITE BP-1519, o una cepa mutante de la misma o una bacteria procesada de la misma, para su uso como inmunoestimulador.

30 Efecto de la invención

En la presente invención, se ha aclarado que la cepa de lactobacilo NTM048 recientemente aislada del guisante tiene una capacidad de promoción de la producción de IgA y una acción de aumento de células T auxiliares. La presente invención puede proporcionar una preparación de lactobacilo y un estimulante de inmunidad (particularmente de inmunidad intestinal), que contiene el lactobacilo o una cepa mutante del mismo y una bacteria procesada del mismo. Dado que se pueden usar en diversos campos, tales como alimentos y bebidas, productos farmacéuticos, alimentos y similares, la presente invención es industrialmente extremadamente útil.

Breve descripción de los dibujos

40 La Fig. 1 muestra los resultados de la capacidad de inducción de la producción de IgA de la cepa de lactobacilo NTM048 aislada en la presente invención. En la figura, el eje vertical muestra la IgA total (ng/ml) en el sobrenadante del cultivo, la solución salina muestra un control negativo (agregado con solución salina sola), el LPS muestra un control positivo (agregado con LPS) y los datos muestran la media \pm error estándar (SE) de 6 experimentos diferentes. ** P <0,01 (frente a solución salina)

45 La Fig. 2 muestra los resultados de comparación de la actividad de inducción de producción de IgA de la cepa NTM048 y otras cepas de *Leuconostoc mesenteroides* (cepa JCM16943 y cepa JCM6124). En la figura, el eje vertical muestra la IgA total (ng/ml) en el sobrenadante del cultivo, la solución salina muestra un control negativo (agregado con solución salina sola) y los datos muestran la media \pm error estándar (SE) de 6 experimentos diferentes. * P <0,05, ** P <0,01 (frente a solución salina)

La Fig. 3 muestra la actividad inductora de la producción de IgA cuando las alimentaciones que contienen la cepa NTM048 en diversas composiciones (el valor numérico en cada gráfico muestra la concentración de NTM048) se

administraron por vía oral al ratón. En la figura, el eje vertical muestra IgA total (ng/mL) en un extracto de heces, y el eje horizontal muestra el número de días de administración, y los datos muestran la media ± error estándar (SE) de un experimento por 5 ratones en la sección de prueba.

5 La Fig. 4 muestra los resultados de comparación de la actividad de inducción de la producción de IgA en la mucosa intestinal de la cepa NTM048 y la cepa JCM6124 in vivo. En la Figura, el eje vertical muestra la cantidad de IgA (µg/día) en las heces de un día, y el eje horizontal muestra el número de días de administración, y el control muestra un control negativo (administrado con medio de dispersión que contiene AIN-76 solo (0,05%) (p/p)). * P <0,05 (contra JCM6124), ** P <0,01 (contra control)

10 La Fig. 5 muestra los resultados de comparación del efecto estimulante de la inmunidad sistémica de la cepa NTM048 y la cepa JCM6124. El panel superior muestra la expresión de CD4, CD8 en los linfocitos T del bazo de los ratones en un grupo control (izquierda), un grupo de administración NTM048 (centro) y un grupo de administración JCM6124 (derecha). En cada figura, el recuadro superior izquierdo muestra células CD4 positivas, el recuadro inferior derecho muestra células CD8 positivas, el panel inferior muestra la proporción (%) de células CD4 positivas-CD3 positivas en cada grupo, y los datos muestran la media ± error estándar (SE).

15 Descripción de las realizaciones

La presente invención se explica en detalle a continuación. La presente invención proporciona un lactobacilo recientemente aislado (cepa NTM048) o una cepa mutante del mismo o una bacteria procesada del mismo, y una preparación de lactobacilo o un agente inmunoestimulador (particularmente de la inmunidad intestinal) y similares que contienen cualquiera de estos.

20 En la presente invención, se aisló un nuevo lactobacilo (cepa NTM048) del guisante mediante el siguiente método. El método de detección y las propiedades bacteriológicas de la cepa NTM048 son los siguientes.

1. Detección

(1) Origen

guisante

25 (2) Método de detección

Utilizando células de parche de Peyer de ratón, se realizó la detección con el aumento de la producción de IgA como índice. Los procedimientos experimentales específicos son como se muestran en los ejemplos mencionados a continuación.

2. Identificación de lactobacilo

30 (1) Cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NTM048

(2) Características visuales

(2-1) Colonia circular blanca en medio de agar MRS.

(2-2) características microscópicas: coco, sin motilidad, la espora no se forma.

(3) Temperatura de crecimiento

35 Crece bien a 30-37°C.

(4) Características fisiológicas y bioquímicas

Tinción de Gram: positiva

La asimilación del azúcar se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

0 control	-	17 inositol	-	34 melecitos	-
1 glicerol	-	18 manitol	+	35 rafinosa	+
2 eritritol	-	19 sorbitol	-	36 almidón	-
3 D-arabinosa	-	20 α-metil-D-manósido	-	37 glucógeno	-
4 L-arabinosa	+	21 α-metil-D-glucósido	+	38 xilitol	-

5 ribosa	+	22 N-acetilglucosamina	+	39 gentiobiosa	+
6 D-xilosa	+	23 amigdalina	+	40 D-turanosev	+
7 L-xilosa	-	24 arbutina	+	41 D-lixosa	-
8 adonitol	-	25 esculina	+	42 D-tagatosa	-
9 β -metil-D-xilósido	-	26 salicina	+	43 D-fucosa	-
10 galactosa	+	27 celobiosa	+	44 L-fucosa	-
11 glucosa	+	28 maltosa	+	45 D-arabitol	-
12 fructosa	+	29 lactosa	-	46 L-arabitol	-
13 manosa	+	30 melibiosa	+	47 gluconato	+
14 sorbosa	-	31 sacarosa	+	48 2-ceto-gluconato	-
15 ramnosa	-	32 trehalosa	+	49 5-ceto-gluconato	+
16 dulcitol	-	33 inulina	-		

Como propiedades taxonómicas químicas, además, se muestra aproximadamente 1,5 kb de ARNr 16S en la SEQ ID N°: 1.

5 A partir de las diversas propiedades anteriores y a la luz del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, esta cepa fue identificada como una nueva cepa perteneciente a *Leuconostoc mesenteroides* y denominada *Leuconostoc mesenteroides* NTM048. La cepa NTM048 se depositó el 25 de enero de 2013 en la Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón. El número de entrada es NITE BP-1519.

10 La cepa de la presente invención también incluye no solo la cepa NTM048 mencionada anteriormente, sino también una variante de la cepa, que muestra, al menos en el tejido linfático asociado a los intestinos de los mamíferos, una acción promotora de la producción de IgA igual o no menor que la de la cepa NTM048. La variante muestra más preferiblemente una acción promotora de la producción de IgA en otros órganos y tejidos (por ejemplo, pulmón, alvéolos pulmonares, plasma, etc.) y una acción de aumento de células T auxiliares en el bazo, médula ósea, sangre y similares, que son iguales o no menores que las de la cepa NTM048. Los ejemplos de un método de introducción de mutación incluyen, pero no se limitan a, un método por un tratamiento con sustancias químicas, tal como un compuesto nitroso (nitrosoamina, nitrosoguanidina, etc.), un agente alquilante (EMS, metanosulfonato de etilo), radiación UV, radiación y similares. Si la cepa mutante obtenida tiene una acción potenciadora de la producción de IgA en los tejidos linfáticos asociados al intestino, que es igual o no menor que la de la cepa NTM048, puede detectarse midiendo la actividad promotora de la producción de IgA de la cepa mutante de acuerdo con un método similar al método utilizado para seleccionar la NTM048 mencionada anteriormente y compararla con la actividad de la cepa NTM048.

En la presente invención, la cepa NTM048 y una variante de la misma se pueden cultivar usando un medio para el cultivo de lactobacilos (medio sólido, medio líquido, etc.) tal como el medio MRS antes mencionado y similares.

25 El medio puede contener diversas vitaminas (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina C, vitamina D, vitamina E, etc., y sus derivados), varios aminoácidos (incluidos aminoácidos naturales y aminoácidos sintéticos), bases de ácidos nucleicos (purina, pirimidina), sales inorgánicas ($MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, NaCl, etc.) y similares, según sea necesario.

30 La cepa de la presente invención se puede preparar cultivando a una temperatura de cultivo de 30-37°C, más preferiblemente 35-37°C, durante un período de cultivo de 16 h-3 días, más preferiblemente de 1-2 días, a pH 3-8, más preferiblemente pH 4-7.

35 Las bacterias procesadas de la presente invención incluyen un medio de cultivo obtenido mediante el método mencionado anteriormente, y/o bacterias húmedas obtenidas tratando el medio de cultivo mediante un método conocido per se, por ejemplo, centrifugación, filtración, separación magnética y similares, o un producto lavado del mismo (es posible el lavado con agua de esterilización, PBS y similares), polvo liofilizado de los mismos, bacterias muertas por calor, bacterias muertas en seco, bacterias muertas químicamente, productos que rompen bacterias tales como la pared bacteriana y similares, un extracto y similares.

Además, los productos de fermentación obtenidos inoculando la cepa NTM048 o una cepa mutante de los mismos

en productos lácteos, cereales, alimentos procesados y similares también se incluyen en las bacterias procesadas de la presente invención.

En la presente invención, la "inmunoestimulación" significa una acción para activar cualquier función inmune que incluya, al menos, la inmunidad intestinal. Particularmente, la acción inmunoestimulador en la presente invención se caracteriza por una acción para promover la producción de IgA en diversos órganos, tejidos, fluidos corporales (por ejemplo, pulmón, alveolos pulmonares, plasma, etc.) incluyendo tejidos linfáticos asociados al intestino. En algunos casos, el control de la producción de IgA también se incluye en el concepto de la inmunoestimulación en la presente invención. Además, la acción inmunoestimulador de la cepa de la presente invención o una bacteria procesada de la misma incluye la activación de la inmunidad adquirida en el sistema inmune sistémico. La activación de la inmunidad adquirida en el sistema inmune sistémico se caracteriza por un aumento de la acción de las células T cooperadoras en el bazo, la médula ósea, la sangre y similares.

Dado que la cepa NTM048 (que también incluye la variante mencionada anteriormente) y una bacteria procesada de la misma tienen una acción estimulante de la inmunidad (particularmente, inmunidad intestinal), se pueden aplicar como estimulantes de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) para seres humanos u otros mamíferos directamente o después de formularse juntos con un aditivo adecuado (preparación de lactobacilo). En este caso, como preparación de lactobacilo, se puede usar de forma individual la cepa NTM048 (que también incluye la variante mencionada anteriormente) o una bacteria procesada de la misma. También es posible usar uno o más tipos de otros lactobacilo o bacterias procesadas de los mismos, y/o uno o más tipos de microorganismos distintos de lactobacilo o bacterias procesadas de los mismos en combinación. Como se usa en el presente documento, "bacterias procesadas" es como se definió anteriormente.

Los ejemplos de otros lactobacilos incluyen, pero no se limitan a, lactobacilo que pertenece al género *Lactobacillus*, el género *Streptococcus*, el género *Leuconostoc*, el género *Pediococcus*, el género *Lactococcus*, el género *Enterococcus*, el género *Bifidobacterium* y similares.

Los ejemplos de microorganismos distintos de lactobacilos incluyen, pero sin limitación, levadura, el género bacilo, bacterias de ácido butírico (*Clostridium butyricum*), hongos tales como bacterias koji y similares, etc.

La cepa NTM048 (que también incluye variantes) o una bacteria procesada de la misma de la presente invención se puede formular usando éstas como ingredientes activos y añadiendo un excipiente, aglutinante, disgregante, lubricante y similares en una preparación de lactobacilos o un estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal).

Ejemplos de los aditivos que pueden usarse para formular incluyen aceites vegetales y animales, tales como aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de germen, aceite de girasol, grasa de vaca, aceite de sardina y similares, alcoholes polivalentes tales como polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, sorbitol y similares, tensioactivos tales como éster de sorbitán de ácido graso, éster de sacarosa de ácido graso, éster de ácido graso de glicerina, éster de poliglicerol de ácido graso y similares, excipientes tales como agua purificada, lactosa, almidón, celulosa cristalina, D-manitol, lecitina, goma arábiga, solución de sorbitol, solución de hidratos de carbono y similares, aglutinantes tales como hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, gelatina, almidón pregelatinizado, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y similares, desintegrantes tales como caramelo cálcico, caramelo sódico, croscarmelosa sódica, crospovidona, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, almidón de maíz y similares, lubricantes tales como talco, aceite vegetal hidrogenado, ceras, ácido silícico anhídrido ligero y similares derivados de sustancias de origen natural y sus derivados, ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de aluminio y similares, etc.

La preparación mencionada anteriormente puede contener adicionalmente un edulcorante, un colorante, un ajustador del pH, un aromatizante, diversos aminoácidos y similares. Además, la tableta y el gránulo pueden estar recubiertos por métodos bien conocidos. Las preparaciones líquidas pueden disolverse o suspenderse en agua u otro medio adecuado cuando se usen.

Como número de cepas bacterianas NTM048 contenidas en la preparación mencionada anteriormente, la cantidad de ingesta diaria no es inferior a 10^4 unidades formadoras de colonias (en lo sucesivo denominadas ufc) y no más de 10^{12} ufc, preferentemente no menos de 10^6 cfu y no más de 10^9 cfu.

El estimulante de inmunidad mencionado anteriormente (particularmente, la inmunidad intestinal) se puede aplicar a enfermedades relacionadas con la inmunidad intestinal. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con la inmunidad intestinal incluyen, pero no se limitan a, alergias a alimentos (alfarfón, arroz, trigo, huevo, leche, cacahuetes, frutas tales como naranja, manzana, kiwi y similares, crustáceos tales como el camarón, el cangrejo y similares, conchas y peces, etc.), alergias al polen (cedro, arroz, ambrosía, vara de oro alta, artemisia, abedul blanco japonés, hierba timotea, hierba de huerta etc.), alergia al polvo de la casa, a sustancias químicas, metales y similares, infecciones (infecciones bacterianas tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, cólera, *Escherichia coli* patógena, estreptococo mutans, *Clostridium*, bacilo de la disentería y similares, infección por virus tales como virus de la gripe, rotavirus, norovirus, virus del herpes y similares, infección por insectos parásitos, infección por protozoos, etc.), enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, etc.), enfermedades

autoinmunes (enfermedad autoinmune específica de órgano y enfermedad autoinmune sistémica), degradación funcional de la inmunidad intestinal por estrés y similares.

5 El estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) de la presente invención se puede usar para la profilaxis o mejora de enfermedades relacionadas con la inmunidad intestinal mediante la administración a seres humanos o animales que no sean humanos (p. ej., perro, gato, ratón, rata, hámster, conejillo de indias, conejo, cerdo, bovino, pollo, perico, gracula religiosa, cabra, caballo, oveja, mono, etc.).

Además, el estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) de la presente invención puede usarse, por ejemplo, como alimento, producto farmacéutico, pienso y similares, o añadiendo el activador al mismo.

10 Cuando el estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) de la presente invención se usa como alimento o aditivo alimentario, la forma del alimento no está particularmente limitada siempre que permita la ingestión oral, tal como en solución, suspensión, polvos, artículo formado por sólidos y similares. Los ejemplos específicos incluyen suplementos (dispersión, gránulo, cápsula blanda, cápsula dura, tableta, tableta masticable, tableta de rápida integración, jarabe, líquido, etc.), bebidas (bebida carbonatada, bebida de ácido láctico, bebida deportiva, jugos de frutas, bebidas vegetales, bebidas de leche de soja, bebidas de café, bebidas de té, bebidas en polvo, bebidas concentradas, bebidas nutritivas, bebidas alcohólicas, etc.), productos lácteos (yogurt, mantequilla, queso, helado, etc.), confitería (gominolas, gelatina, goma de mascar, chocolate, galletas, golosinas, caramelos, confitería japonesa, aperitivos, etc.), comida instantánea (fideos instantáneos, comidas de retorta, latas, alimentos para microondas, sopa instantánea, sopas de miso, alimentos liofilizados, etc.), aceites, grasas y aceites alimenticios (mayonesa, aderezo, nata, margarina, etc.), productos de trigo en polvo (pan, pasta, fideos, mezcla para pasteles, migas de pan, etc.), condimentos (salsas, condimentos para el procesamiento del tomate, condimentos aromáticos, mezclas para cocinar, sopas, etc.), productos cárnicos procesados (jamón de carne, salchichas, etc.).

25 Los alimentos antes mencionados pueden contener, cuando sea necesario, varios nutrientes, diversas vitaminas (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, etc.), varios minerales (magnesio, zinc, hierro, sodio, potasio, selenio, etc.), fibras dietéticas, agentes dispersantes, estabilizadores tales como emulsionantes y similares, edulcorantes, componentes aromatizantes (ácido cítrico, ácido málico, etc.), aromatizantes, jalea real, propóleo, Agaricus y similares.

30 Cuando el estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) de la presente invención se usa como un producto farmacéutico o aditivo farmacéutico, la forma de dosificación del producto farmacéutico incluye una dispersión, gránulo, píldora, cápsula blanda, cápsulas duras, tableta, tableta masticable, tableta integradora rápida, jarabe, líquido, suspensión, supositorio, pomada, crema, gel, adhesivo, inhalante, inyección y similares. La preparación de los mismos se prepara de acuerdo con métodos convencionales.

35 Los ejemplos de composiciones para administración oral incluyen formas de dosificación sólidas o líquidas, específicamente tabletas (incluyendo tabletas recubiertas de azúcar, tabletas recubiertas con películas), píldoras, gránulos, polvos, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas), jarabes, emulsiones, suspensiones y similares. Dichas composiciones se producen mediante métodos conocidos y pueden contener un vehículo, diluyente o excipiente, generalmente usados en el campo farmacéutico. Como vehículo, se usan excipientes para tabletas, lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio.

40 Como composición para la administración parenteral, se usan las inyecciones, los supositorios y similares. Un método de preparación de inyección incluye suspender o emulsionar la cepa o una de sus bacterias procesadas de la presente invención en una solución acuosa aséptica o solución oleosa generalmente utilizada para la inyección. Como solución acuosa para la inyección, se usa una solución salina, isotónica que contiene glucosa u otro agente auxiliar, y similares. Como soluciones oleosas, se usan aceite de sésamo, aceite de soja y similares. Se puede preparar un supositorio para la administración rectal mezclando la cepa de la presente invención o una bacteria procesada de la misma con una base general para supositorio.

45 Cuando se usa como producto farmacéutico, el estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) de la presente invención se puede usar en combinación con otro medicamento, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, antibióticos, agentes antiviral, antitoxinas, agentes antialérgicos y similares de acuerdo con la enfermedad objetivo. El estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) y el medicamento mencionado anteriormente de la presente invención se pueden administrar simultáneamente o en diferentes momentos a un sujeto.

55 Los ejemplos de fármacos concomitantes preferibles para el estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) de la presente invención incluyen sustancias (prebióticos) que promueven el crecimiento y/o el metabolismo de los lactobacilos contenidos en el estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal). Dichos prebióticos pueden añadirse al estimulante de la inmunidad (particularmente de la inmunidad intestinal) de la presente invención junto con la cepa de la presente invención, o administrarse como una preparación separada simultáneamente o en momentos diferentes a un sujeto.

Para la administración en forma de una inyección, son preferibles las administraciones intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraperióstica, sublingual, oral y

similares, y son particularmente preferibles la administración intravenosa o la administración intraperitoneal. La administración intravenosa puede ser cualquiera de administración por goteo y administración en bolo.

5 Cuando el agente de protección del tracto intestinal de la presente invención se usa como un alimento o un aditivo para la alimentación, el alimento es, por ejemplo, alimento para mascotas, aditivo para piensos de ganadería o de acuicultura y similares.

10 En la presente invención, la producción de IgA puede medirse mediante un método conocido per se. Por ejemplo, el parche de Peyer se prepara mediante el método que usa colagenasa como se muestra en los Ejemplos a continuación y similares, el parche de Peyer se cultiva en presencia de lactobacilos, y se recupera el sobrenadante del cultivo. La cantidad de IgA contenida en el sobrenadante del cultivo se mide mediante un método conocido per se tal como el método ELISA (kit de medición de IgA disponible comercialmente, etc.) y similares. A partir de entonces, los cambios en la cantidad de IgA se confirman comparando con un grupo de control (por ejemplo, solución salina como control negativo, LPS, etc. como control positivo).

15 El parche de Peyer puede seleccionarse independientemente del mismo tipo, tal como ratón, rata, ser humano y similares y el método de producción del mismo no está limitado a los métodos mencionados anteriormente y los expertos en la técnica pueden seleccionarlos apropiadamente según sea necesario. Alternativamente, para medir la actividad promotora de la producción de IgA in vivo, se puede recoger una muestra biológica (sangre, heces, etc.) de un individuo (ratón, rata, ser humano, etc. independientemente del tipo) y pueden confirmarse los cambios en la cantidad de IgA en la muestra.

20 La presente invención se explica con más detalle a continuación con referencia a los Ejemplos. Los ejemplos son meras ejemplificaciones de la presente invención.

Ejemplos

Reactivos y cepas

Medio RPMI-10: medio RPMI 1640 (fabricado por Gibco) añadido con suero de ternera fetal al 10%, medio MRS (fabricado por Difco), colagenasa (fabricada por Sigma), DNasa (fabricada por Takara)

25 Cepa NTM048: aislada de arveja (n.º de entrada: NITE BP-1519, fecha de deposición: 25 de enero de 2013)

JCM16943 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris*), JCM6124 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*): adquirido de RIKEN, Tsukuba, BioResource Center, Japan Collection of Microorganism (JCM)

Ejemplo de referencia 1: Preparación de células de parche de Peyer por el método de producción de la colagenasa

30 Se aislaron células de parche de Peyer del intestino delgado a partir de ratones BALB/cA de 7 semanas de edad. Las células se lavaron con medio RPMI-10, se transfirieron a una placa estéril que contenía 5 ml de solución disociadora de IEC (HEPES 25 mM, EDTA 5 mM, DTT 1 mM en RPMI-10) y se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 45 min. Después de pipetear bien, las células se transfirieron a un plato estéril que contenía 5 ml de solución de EDTA (EDTA 5 mM en RPMI-10), y se incubaron en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 5 minutos. Después de pipetear bien, el parche de Peyer se transfirió a un tubo de 50 ml que contenía 5 ml de solución de digestión (400 U/ml de colagenasa, 30 U/ml de ADNasa en RPMI-10) y un agitador, y se incubó con agitación a 37°C durante 30 min. Una vez completada la descomposición enzimática, las células de parche de Peyer suspendidas en el medio estaban turbias. Se centrifugaron (1400 rpm, 7 min, 4°C) y se eliminaron 4 mL del sobrenadante por succión. Se pasó una suspensión (1 ml) de las células de parche de Peyer a través de un filtro celular de 40 µm, se centrifugó (1400 rpm, 7 min, 4°C), el sobrenadante se eliminó por succión y se suspendió en 1 ml de medio RPMI-10. Las células se contaron y se usaron para medir la actividad de la función inmune.

Ejemplo 1: Medición de la cantidad de producción de IgA

Se investigaron aproximadamente 200 cepas de lactobacilo aisladas de diversos vegetales crudos y encurtidos para determinar la capacidad de promoción de la producción de IgA usando células de parche de Peyer del intestino delgado de ratón.

45 La concentración de células de parche de Peyer obtenidas mediante el método de producción de colagenasa antes mencionado se ajustó a $2,5 \times 10^5$ células/ml en una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo CD3 (fabricada por BD Biosciences). A la suspensión de células de parche de Peyer se añadió una cantidad igual de lactobacilo que tenía una concentración ajustada a 10 µg/ml con solución salina después de cultivo líquido en medio MRS, y la mezcla se hizo reaccionar a 37°C en condiciones anaeróbicas de 5% de CO₂ durante 5 días, y la cantidad total de IgA producida se midió usando un conjunto de cuantificación ELISA de IgA de ratón (fabricado por BETHYL). Se seleccionaron dos cepas de lactobacilo (NTM047, NTM048) que tenían una capacidad de producción de IgA significativamente alta. Los resultados de la cepa de lactobacilo NTM048 se muestran en la FIG. 1.

50 Las cepas NTM047 y NTM048 se trataron térmicamente a 70°C durante 30 minutos, y las bacterias muertas obtenidas se examinaron de forma similar para determinar la capacidad de producción de IgA usando células de

parche de Peyer. Como resultado, se confirmó que ambas cepas tenían una capacidad de promoción de la producción de IgA como la de las bacterias vivas. Los resultados sugieren que las sustancias que promueven la producción de IgA por la cepa NTM047 y la cepa NTM048 son las paredes bacterianas o los componentes extrabacterianos. Además, la identificación de especies se intentó mediante el análisis de la secuencia de 16S rDNA. Como resultado, se aclaró que las dos cepas eran las mismas cepas.

Ejemplo 2: Comparación con la variedad tipo

Mediante un método similar al del Ejemplo 1, se comparó la actividad promotora de la producción de IgA in vitro entre la cepa NTM048 y JCM16943 y JCM6124 utilizando el parche de Peyer. Los resultados se muestran en la fig. 2.

Se confirmó que la cepa NTM048 induce altamente la producción de IgA en comparación con otras cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

Ejemplo 3: Confirmación de la actividad de promoción de producción de IgA in vivo

Se criaron preliminarmente ratones BALB/c macho de 5 semanas de edad (alimentación libre de lactobacilos, AIN-76) durante 2 semanas, se administró AIN-76 que contenía 0, 0,05, 0,5, 5% de lactobacilos NTM048 a 5 ratones en cada grupo de prueba durante 2 semanas, las heces se recogieron los días 0, 7, 14 y se confirmó la cantidad de IgA. Después de la recolección, las heces se liofilizaron durante 6 horas y se suspendieron en una proporción de peso de heces de 10 mg/200 µL en un tampón de extracción (PBS) que contenía Cóctel Inhibidor de Proteasa (fabricado por Roche). La suspensión se agitó en vórtice, se enfrió con hielo durante 30 min, se centrifugó (15000 rpm, 10 min, 4°C) y la cantidad total de IgA extraída en el sobrenadante se midió mediante el método ELISA como se menciona anteriormente.

La composición de la alimentación se muestra en la Tabla 2, y los resultados de la promoción de la producción de IgA se muestran en la FIG. 3.

Tabla 2

Grupo de ensayo	Composición de alimentación (%)		Composición de alimentación (g)				CFU/g (alimento)
	bacterias (%)	cuerpo bacteriano (%)	AIN-76	bacterias	medio dispersante	total	
1	0	0	95	0	5	100	0
2	0,05	0,0038	95	0,05	4,95	100	$7,1 \times 10^8$
3	0,5	0,038	95	0,5	4,5	100	$7,1 \times 10^9$
4	5	0,38	95	5	0	100	$7,1 \times 10^{10}$

El día 14, la cantidad de IgA aumentó en todos los grupos de administración de bacterias, y se encontró una diferencia significativa (P <0,01, P <0,05) en ratones de administración de la cepa NTM048 al 0,5% y al 5%.

Ejemplo 4: Comparación con la cepa tipo en la actividad in vivo que promueve la producción de IgA

Se criaron preliminarmente ratones macho BALB/c de 6 semanas de edad (alimentación libre de lactobacilos, AIN-76) durante 2 semanas, se administró la cepa NTM048 que contenía AIN-76 al 0,0038% (p/p) o la cepa JCM6124 basadas en bacterias liofilizadas a 6 ratones en cada grupo de prueba durante 2 semanas, las heces durante 24 horas se recogieron en los días 0, 7, 14 y se midió el peso después de la liofilización para determinar la cantidad diaria de heces. Las heces se pulverizaron en un mortero, se liofilizaron nuevamente, se dispensaron 50 mg en un tubo Eppendorf y se suspendieron en una proporción de heces de 10 mg/200 µL en un tampón de extracción (PBS) que contenía Cóctel Inhibidor de Proteasa (fabricado por Roche). Después de agitar en vórtice, las heces se agitaron de nuevo en vórtex cada 10 minutos, se colocaron en hielo y, después de 30 min, se centrifugaron a 4°C, a 15000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. La concentración de IgA en el sobrenadante se midió mediante el método ELISA como se menciona anteriormente, y la cantidad de IgA en las heces de un día se determinó a partir de la concentración de IgA obtenida y el peso de las heces durante 24 horas. Los resultados se muestran en la fig. 4.

Se confirmó que la cepa NTM048 también inducía altamente la producción de IgA in vivo en la mucosa intestinal en comparación con la cepa JCM6124.

Ejemplo 5: Análisis del subtipo de células T en células de bazo de ratón

Para examinar la influencia de la administración de la cepa NTM048 en el sistema inmune sistémico, se compararon subtipos de células T en células de bazo.

5 La cepa NTM048 o la cepa JCM6124 se administró a ratones durante 3 semanas, y se aislaron los bazos. Se preparó una suspensión de células de bazo suspendiendo las células de bazo recogidas físicamente usando una
10 aguja para inyección en medio RPMI 10, tratándolas con un tampón de hemólisis (0,83% NH₄Cl, 0,1% KHCO₃, 0,0037% EDTA₂Na) durante 5 min, lavando las mismas con medio RPMI 10 y pasando las mismas a través de un colador de células de 70 μm. Utilizando células del bazo a 1 × 10⁶ células, se realizó el análisis del subtipo CD4, CD8 de células T. Utilizando el cóctel de anticuerpos del subconjunto de linfocitos T de ratón (BD Biosciences) y según el protocolo del producto, las células se marcaron con anticuerpo anti-CD3e marcado con PE-Cy™7, anticuerpo anti-CD4 marcado con PE y el anticuerpo anti-CD8a marcado con APC, y se midieron las células CD3 positivas (células T), células CD4 positivas (células T cooperadoras) y células CD8 positivas (células T asesinas) mediante un citómetro de flujo (BD FACSAria). Los resultados se muestran en la fig. 5.

15 La relación de células CD8 positivas y CD3 positivas no mostró una diferencia significativa entre ninguno de los grupos de administración de lactobacilos y el grupo control (Figura 5, arriba), y la proporción de células CD4 positivas y CD3 positivas tendió a aumentar en comparación con el grupo control (p = 0,06) y el grupo de administración de JCM6124 (Figura 5 arriba, abajo). Estos resultados sugieren que también se puede esperar el efecto estimulante de la inmunidad de la cepa NTM048 en el sistema de inmunidad sistémica (particularmente de inmunidad adquirida).

20 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención aclaró que el lactobacilo recientemente aislado e identificado (cepa NTM048) tiene una alta capacidad de promoción de la producción de IgA. La cepa, una bacteria procesada de la misma y similares, tiene una alta capacidad de promoción de la producción de IgA, y se puede aplicar a diversos campos tales como productos farmacéuticos, alimentos, piensos y similares. Por lo tanto, la presente invención es industrialmente
25 extremadamente útil.

Listado de secuencias

<110> NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Agente inmunoestimulador

<130> 092126

<150> JP 2013-033072

<151> 2013-02-22

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1516

<212> ADN

<213> *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

<400> 1

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac      60
gcacagcgaa aggtgcttgc acctttcaag tgagtggcga acgggtgagt aacacgtgga     120
caacctgcct caaggctggg gataacattt ggaaacagat gctaataccg aataaaaactt     180
agtgtcgcat gacacaaagt taaaaggcgc ttcggcgtca cctagagatg gatccgcggt     240
gcattagtta gttggtgggg taaaggccta ccaagacaat gatgcatagc cgagttgaga     300
gactgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gctgcagtag     360
ggaatcttcc acaatggggc aaagcctgat ggagcaacgc cgcgtgtgtg atgaaggctt     420
tcgggtcgta aagcactggt gtatgggaag aacagctaga ataggaaatg attttagttt     480
gacggtacca taccagaaag ggacggctaa atacgtgcca gcagccgcyg taatacgtat     540
gtcccagcgc ttatccggat ttattgggcyg taaagcgagc gcagacggtt tattaagtct     600
gatgtgaaag cccggagctc aactccggaa tggcattgga aactggttaa cttgagtgca     660
gtagaggtaa gtggaactcc atgtgtagcyg gtggaatgcyg tagatatatg gaagaacacc     720
agtggcgaag gcggcttact ggactgcaac tgacgttgag gctcgaaagt gtgggtagca     780
aacaggatta gataccctgy tagtccacac cgtaaacgat gaacactaggy tgttaggaggy     840
tttccgcctc ttagtgccga agctaacgca ttaagtgttc cgctgggga gtacgaccgc     900
aaggttgaag ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cggtgagca tgtggtttaa     960
ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tttgaagcct ttagagatag    1020
aagtgttctc ttcggagaca aagtgacaggy tgggtgatgy tctctctcag ctcgtgtcgt    1080
gagatgttgy gttaagtccc gcaacgagcy caacccttat tgttagttgc cagcattcag    1140
atgggcactc tagcgagact gccggtgaca aaccggaggy aggcggggac gacgtcagat    1200
catcatgccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggcgtatac aacgagttgc    1260
caaccgcgca ggggtgagcta atctcttaa gtacgtctca gttcggattg tagtctgcaa    1320
ctcgactaca tgaagtcgga atcgctagta atcgcgatc agcacgccgc ggtgaatacyg    1380
ttcccgggcy ttgtacacac cgcctgcac accatgggag tttgtaatgc ccaaagccgy    1440
tggcctaacc ttttaggaag gagccgtcta aggcaggya gatgactgggy gtgaagtcgt    1500
aacaaggya ccytaa
    1516

```

REIVINDICACIONES

1. La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 depositada con el número de entrada NITE BP-1519, o una cepa mutante de la misma o una bacteria procesada de la misma.
- 5 2. Una preparación de lactobacilo que comprende la cepa según la reivindicación 1 o una bacteria procesada de la misma.
3. La preparación de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además otro lactobacilo o una bacteria procesada de la misma, y/o un microorganismo distinto de lactobacilo o una bacteria procesada de la misma.
- 10 4. La preparación de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el otro lactobacilo es al menos un tipo seleccionado entre la bacteria *Lactobacillus*, la bacteria *Streptococcus*, la bacteria *Leuconostoc*, la bacteria *Pediococcus*, la bacteria *Lactococcus*, la bacteria *Enterococcus* y la bacteria *Bifidobacterium*.
5. La preparación de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en la que el microorganismo distinto de lactobacilo es al menos un tipo seleccionado de levadura, bacterias *Bacillus*, bacterias de ácido butírico (*Clostridium butyricum*) y hongos.
- 15 6. Un producto farmacéutico representado por la preparación de lactobacilo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
7. La preparación como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para su uso como un agente inmunoestimulador.
8. La preparación para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 como inmunoestimulador intestinal.
- 20 9. La preparación como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para su uso en la profilaxis o mejora de una enfermedad relacionada con la inmunidad intestinal.
10. La preparación para su uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad relacionada con la inmunidad intestinal se selecciona del grupo que consiste en enfermedades alérgicas, infecciones, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedades autoinmunes.
- 25 11. Un alimento o un aditivo alimentario representado por la preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
12. Un alimento o un aditivo alimentario representado por la preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
13. Un agente inmunoestimulador representado por la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 depositada con el número de entrada NITE BP-1519, o una cepa mutante del mismo o una bacteria procesada del mismo.
- 30 14. La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 depositada con el número de entrada NITE BP-1519, o una cepa mutante de la misma o una bacteria procesada de la misma, para su uso como inmunoestimulador.

Fig. 1

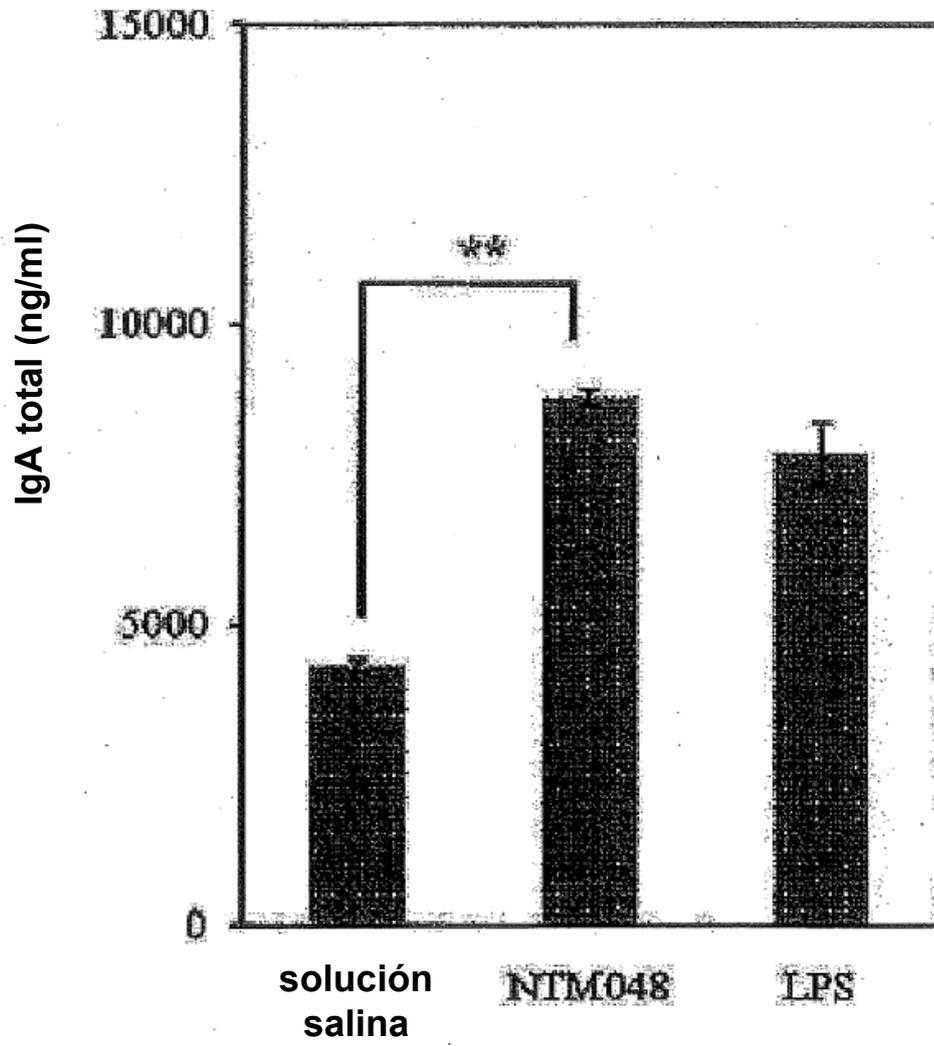


Fig. 2

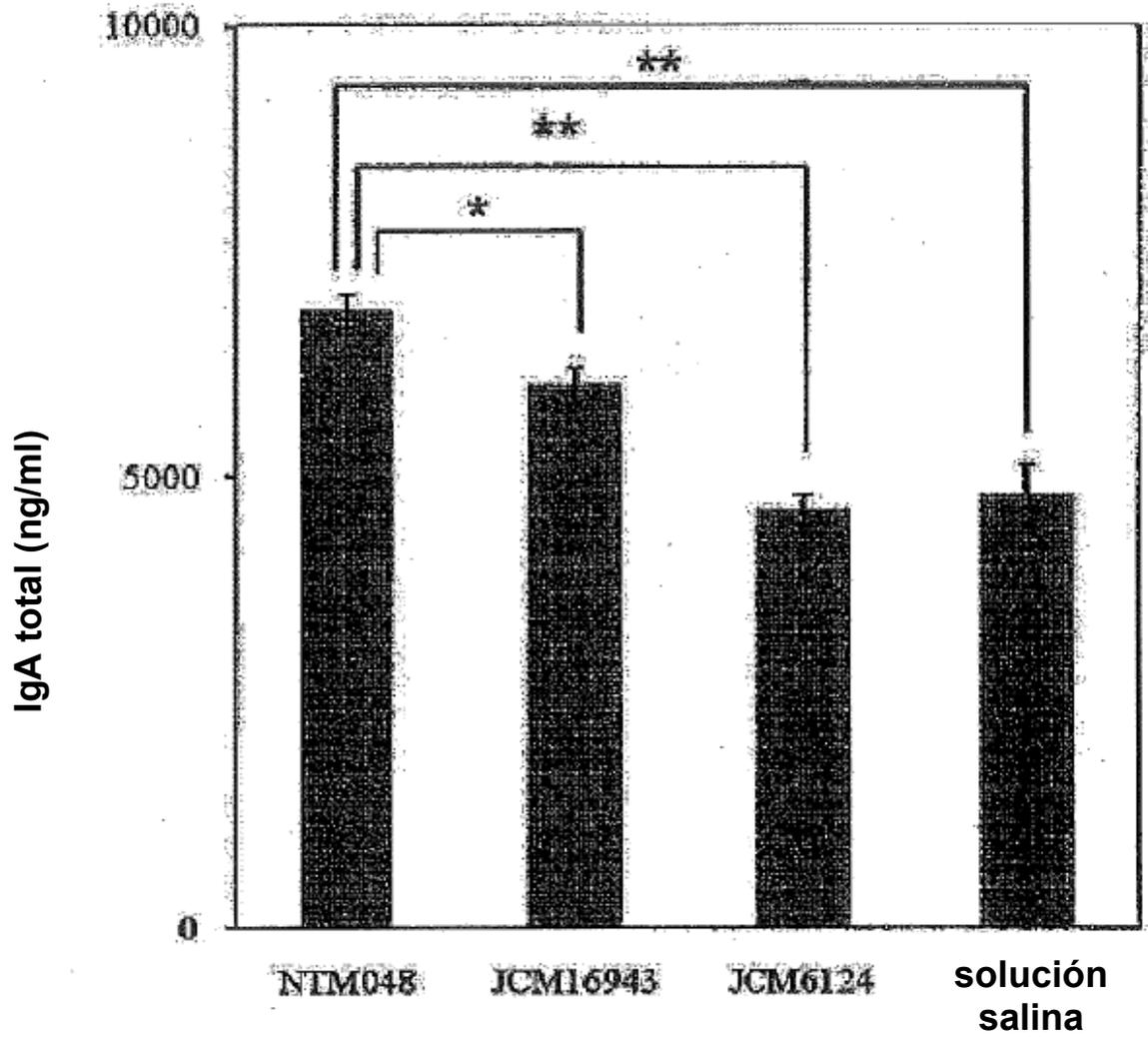


Fig. 3

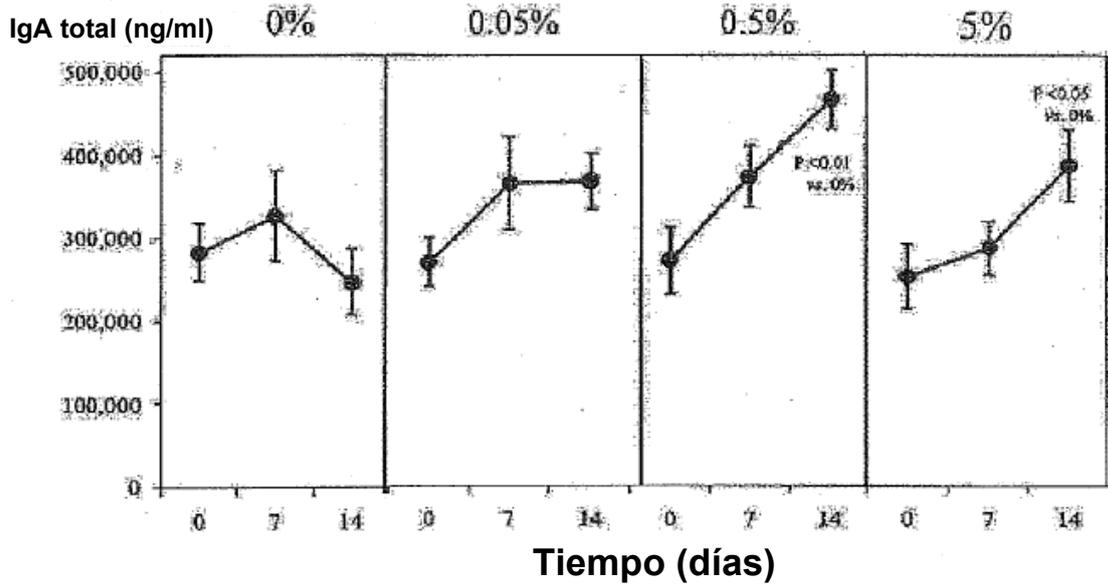


Fig. 4

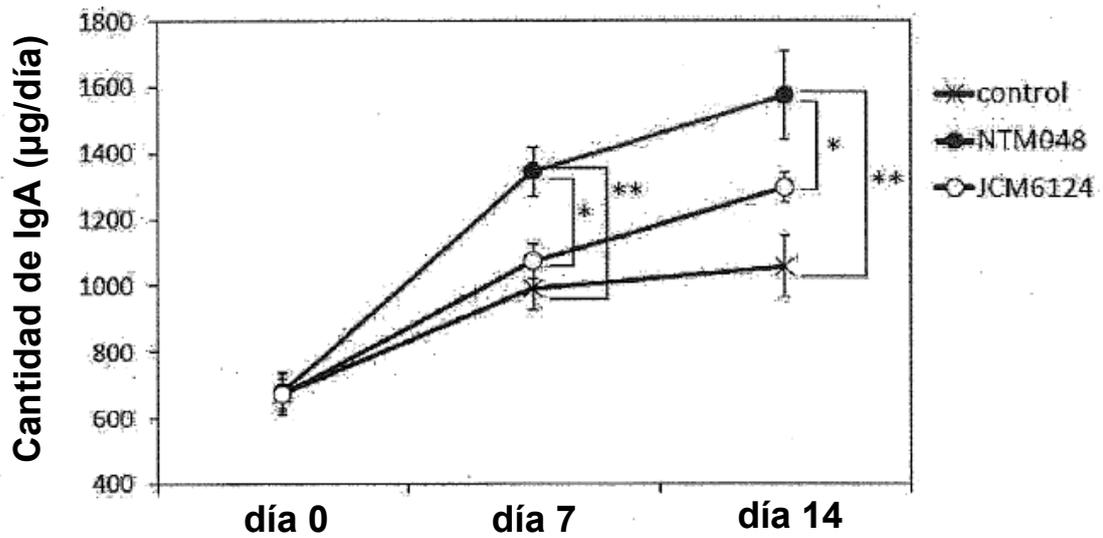


Fig. 5

