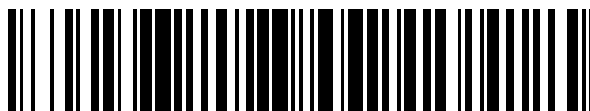


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 813**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
A23L 33/10	(2006.01) C12R 1/225	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01) A23K 10/12	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01) A23K 10/16	(2006.01)
A61P 31/16	(2006.01) A23K 10/18	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01) A23L 33/135	(2006.01)
A61K 35/747	(2015.01)	
A23L 2/52	(2006.01)	
A61K 39/145	(2006.01)	
A61K 35/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2014 PCT/JP2014/057319**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15004949**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2014 E 14823722 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2940124**

54 Título: **Nueva bacteria de ácido láctico, fármaco, producto alimenticio o bebida, y pienso que contienen la nueva bacteria de ácido láctico**

30 Prioridad:

12.07.2013 JP 2013146319

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2018

73 Titular/es:

**MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. (100.0%)
33-1 Shiba 5-chome
Minato-ku, Tokyo 108-8384, JP**

72 Inventor/es:

**TANAKA, TOMOHIRO;
IWABUCHI, NORIYUKI;
SATO, YOHEI;
SHIMIZU, KANETADA y
ODAMAKI, TOSHITAKA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 660 813 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nueva bacteria de ácido láctico, fármaco, producto alimenticio o bebida, y pienso que contienen la nueva bacteria de ácido láctico

Campo técnico

La presente invención se refiere a una nueva bacteria de ácido láctico perteneciente a *Lactobacillus paracasei*, un fármaco, un producto alimenticio o una bebida, y pienso que contienen la bacteria de ácido láctico.

Antecedentes de la técnica

Se ha notificado que algunas bacterias de ácido láctico muestran una acción profiláctica y una acción defensiva contra diversas enfermedades infecciosas (documento no patente 1). Asimismo, se ha notificado que estas acciones de las bacterias de ácido láctico se basan en la activación de la inmunidad del hospedador mediada por células, la promoción de la secreción de IgA de las mucosas, tales como las del tracto intestinal y órganos respiratorios (documento no patente 1), etcétera. Por ejemplo, se ha notificado que las bacterias de ácido láctico pertenecientes a *Lactobacillus casei* inducen la producción de citocinas tales como IL-12 (interleucina-12) e IFN- γ (interferón- γ) por medio de células inmunocompetentes de hospedadores para activar la inmunidad del hospedador mediada por células y, de este modo, defender a los hospedadores de la infección por virus de la gripe, etcétera (documentos no patente 2 a 4).

IL-12 e IFN- γ son citocinas que tienen una acción de inducción de la diferenciación de los linfocitos T auxiliares no tratados previamente en linfocitos T auxiliares tipo 1 (Th1), una acción de activación de los linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK), y una acción de promoción de la fagocitosis de las células tales como macrófagos, y están implicadas en las acciones defensivas contra las infecciones por virus o bacterias y el efecto antitumoral de los hospedadores. Por lo tanto, con el fin de adquirir una acción profiláctica alta y una acción defensiva de bacterias de ácido láctico contra enfermedades infecciosas, es importante utilizar una bacteria de ácido láctico que tenga una potente capacidad para inducir la producción de IL-12. Como tales bacterias de ácido láctico, se conoce la cepa de *Lactobacillus paracasei* FERM BP-11313, que muestra una alta capacidad de supervivencia en condiciones ácidas, y una capacidad superior para inducir la producción de IL-12 (documento de patente 1, en esta referencia, esta cepa también se denomina cepa MCC1375).

También se ha sugerido la implicación de las paredes celulares de las bacterias de ácido láctico en la inducción de la producción de IL-12 por las bacterias de ácido láctico (documento de patente 2), y se ha notificado que en caso de que las bacterias de ácido láctico se traten con una enzima que digiere la pared celular (N-acetil muramidasa), la capacidad para inducir la producción de IL-12 se echa a perder (documento no patente 5). Se ha sugerido asimismo que los ARN contenidos en bacterias de ácido láctico participan en la inducción de la producción de IL-12 por medio de bacterias de ácido láctico, y se ha notificado que si las células muertas de las bacterias de ácido láctico eliminadas por calentamiento se tratan con RNasa, la capacidad para inducir la producción de IL-12 se echa a perder notablemente (documento no patente 6). Hasta la fecha, también se han proporcionado inmunoestimulantes que utilizan ARN de las propias bacterias de ácido láctico (documentos de patente 3 y 4).

Dado que los organismos humanos contienen enzimas que digieren la pared celular, tales como lisozima que tiene actividad N-acetil muramidasa contra las bacterias, se considera que las bacterias de ácido láctico incorporadas en los cuerpos están influidas por esas enzimas. Además, existen RNasas en cualquier parte del medio ambiente, y son extremadamente estables frente al calor. Por lo tanto, contaminan productos con facilidad, no se inactivan por esterilización o similares, y pueden permanecer en los productos. Además, dado que las RNasas también existen en cuerpos humanos, por ejemplo, en la saliva y en los jugos digestivos, se considera que las bacterias de ácido láctico también se ven influidas por RNasas una vez tomadas por vía oral en los cuerpos.

Incluso si las bacterias de ácido láctico tienen inherentemente una alta capacidad de inducción de IL-12, las mismas no pueden mantener y exhibir una capacidad suficiente para inducir IL-12 en los cuerpos vivos, puesto que están influidas por las enzimas que digieren la pared celular (N-acetil muramidasa) y RNasas existentes en saliva o jugos digestivos. Se considera que las cantidades de secreción de estas enzimas que digieren la pared celular y RNasas difieren entre individuos, y firmemente se considera que tal diferencia establece posiblemente diferencias del efecto observado entre individuos.

Referencias de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: publicación de patente internacional WO2012/133827

Documento de patente 2: patente japonesa abierta a inspección pública (sin examinar) n.º 2009-155221

Documento de patente 3: publicación de patente internacional WO2009/005124

Documento de patente 4: publicación de patente internacional WO2011/027829

Documentos no patentes

Documento no patente 1: Delcenserie, V. *et al.*, *Curr. Issues Mol. Biol.* (2008) 10:37-54

Documento no patente 2: Hori T. *et al.*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (2002) 9:105-108

5 Documento no patente 3: Takeda, K. *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* (2006) 146:109-115

Documento no patente 4: Ogawa, T., *Clin. Exp. Immunol.* (2006) 143:103-109

Documento no patente 5: Shida, K. *et al.*, *J. Dairy Sci.* (2006) 89:3306-3317

Documento no patente 6: Inoue, R. *et al.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (2011) 61:94-102

10 **Sumario de la invención**

Objeto a conseguir por la invención

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar una bacteria de ácido láctico que sea útil para la profilaxis y la defensa contra diversas infecciones, es decir, una bacteria de ácido láctico que muestra una alta acción para promover la producción de IL-12 o acción de inmunoestimulación, cuyas acciones no se reducen preferentemente con facilidad en cuerpos humanos etc.

Medios para la consecución del objeto

20 A fin de lograr el objeto mencionado anteriormente, los inventores de la presente invención buscaron asiduamente dichas bacterias de ácido láctico diana, y hallaron una nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* con una alta acción para promover la producción de IL-12. Por consiguiente, llevaron a cabo la presente invención.

25 Es decir, la presente invención proporciona la cepa de *Lactobacillus paracasei* MCC1849 (NITE BP-01633).

La presente invención también proporciona un fármaco que contiene la cepa.

30 En una realización preferente del fármaco antes mencionado, el fármaco es para inmunoestimulación.

En una realización preferente del fármaco antes mencionado, el fármaco es para antivirüs.

En una realización preferente del fármaco antes mencionado para antivirüs, el fármaco es para virus antigripal.

35 La presente invención también proporciona un producto alimenticio o bebida que contiene la cepa.

La presente invención también proporciona un pienso que contiene la cepa.

40 La presente invención también proporciona un agente para promover la producción de IL-12 que contiene la cepa.

En una realización preferente del agente para promover la producción de IL-12 mencionado anteriormente, el agente se encuentra en forma de producto alimenticio o bebida.

Breve descripción de los dibujos

45 La Fig. 1 muestra cantidades de IL-12 producida a partir de células de bazo de ratón en presencia de bacterias de ácido láctico. Las cepas de una bacteria de ácido láctico se indican en el eje horizontal, y el eje vertical indica la media y la desviación típica (D.T.) de la cantidad de producción de IL-12.

La Fig. 2 muestra una acción para prevenir una infección por virus de la gripe de la cepa MCC1849.

50 La Fig. 2, (a) muestra las puntuaciones de los síntomas determinadas tras la infección. El símbolo * indica la presencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos en el día de observación.

La Fig. 2 (b) muestra las concentraciones de virus en los pulmones. El símbolo * indica la presencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos. El análisis estadístico se realizó utilizando el ensayo de Dunnett.

55

Realizaciones para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la presente invención se explicará en detalle.

60 La presente invención se refiere a la cepa de *Lactobacillus paracasei* MCC1849 (NITE BP-01633), que es una nueva cepa de una bacteria de ácido láctico perteneciente a *Lactobacillus paracasei*. Esta cepa, en adelante, también se denomina la "bacteria de ácido láctico de la presente invención", o la "cepa de la presente invención", o simplemente la cepa MCC1849.

65 La bacteria de ácido láctico de la presente invención se aisló de las heces de seres humanos como una fuente de aislamiento. Las características bacteriológicas de esta cepa se mostrarán en el Ejemplo 1 descrito más adelante.

Esta cepa se depositó el 6 de junio de 2013 en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación NITE (por sus siglas en inglés), una agencia administrativa independiente, Depositario de Microorganismos de Patentes (n.º 122, 2-5-8, Kazusakamataari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón) con número de acceso de NITE P-01633, y el depósito se convirtió en un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest el 31 de enero de 2014, y se le dio el número de acceso de NITE BP-01633.

La bacteria de ácido láctico de la presente invención no se limita a la cepa depositada antes mencionada, y puede ser una cepa esencialmente equivalente a la cepa depositada. Tal cepa esencialmente equivalente es una cepa perteneciente a *Lactobacillus paracasei*, que exhibe una acción para promover la producción de IL-12 a un nivel comparable al exhibido por la cepa depositada, y que exhibe preferentemente una reducción de la acción para promover la producción de IL-12 a un nivel bajo comparable al exhibido por la cepa depositada, incluso después de efectuar un tratamiento con una enzima que digiere la pared celular o RNasa. Además, la cepa esencialmente equivalente muestra adicionalmente una homología de la secuencia de nucleótidos del gen de ARNr 16S del 98 % o más, preferentemente 99 % o más, más preferentemente 100 %, con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen de ARNr 16S de la cepa depositada antes mencionada, y preferentemente tiene las mismas características bacteriológicas que las de la cepa depositada antes mencionada. Es más, la bacteria de ácido láctico de la presente invención puede ser una cepa cultivada a partir de la cepa depositada o una cepa esencialmente equivalente a la cepa depositada mediante un tratamiento de mutación, recombinación génica, selección de una cepa mutada naturalmente o similares, siempre que el efecto de la presente invención no se degrade.

La cepa MCC1849 tiene una mayor actividad para promover la producción de IL-12 (interleucina-12) en comparación con las bacterias de ácido láctico conocidas. A pesar de que la actividad para promover la producción de IL-12 de las bacterias de ácido láctico está en general notablemente reducida por un tratamiento con una enzima que digiere la pared celular, tal como N-acetil muramidasa o RNasa, la cepa MCC1849 muestra una menor reducción de la actividad para promover la producción de IL-12 incluso después de un tratamiento con una enzima que digiere la pared celular o RNasa. La actividad para promover la producción de IL-12 puede medirse por el método descrito en la sección de Ejemplos.

Puede provocarse la proliferación de la cepa MCC1849 con facilidad por medio de, por ejemplo, el cultivo de la cepa. El método de cultivo no está particularmente limitado siempre que la cepa MCC1849 pueda proliferar, y un método generalmente utilizado para el cultivo de bacterias de ácido láctico puede ser modificado apropiadamente cuando sea necesario, y utilizado. Por ejemplo, la temperatura del cultivo puede estar comprendida entre 25 y 50 °C, y está comprendida preferentemente entre 35 y 42 °C. Aunque el cultivo puede llevarse a cabo en condiciones aeróbicas, o en condiciones anaeróbicas, el cultivo se realiza preferentemente en condiciones anaeróbicas, por ejemplo, suministrando un gas anaeróbico tal como gas dióxido de carbono. El cultivo también se puede realizar en condiciones microaeróbicas como cultivo estacionario líquido, o similares.

El medio para cultivar la cepa MCC1849 no está particularmente limitado, y un medio generalmente utilizado para el cultivo de bacterias de ácido láctico puede ser modificado apropiadamente cuando sea necesario, y utilizado. Es decir, como fuente de carbono, se pueden utilizar, por ejemplo, sacáridos tales como galactosa, glucosa, fructosa, manosa, celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, almidón, hidrolizado de almidón y melaza residual de acuerdo con las características de asimilación. Como fuente de nitrógeno, se pueden utilizar, por ejemplo, amoníaco, sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y nitratos. Además, como sales inorgánicas, se pueden utilizar, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, nitrato de calcio, cloruro de manganeso, sulfato ferroso, etcétera. Es más, también se pueden utilizar componentes orgánicos tales como peptona, harina de soja, harina de soja desgrasada, extracto de carne y extracto de levadura. Además, como medio preparado, se puede utilizar preferentemente, por ejemplo, el medio MRS.

Al igual que la cepa MCC1849, el cultivo obtenido al cultivar la cepa se puede utilizar tal cual, o se puede utilizar después de una dilución o concentración, o también se pueden utilizar las células recogidas del cultivo. Además, siempre que el efecto de la presente invención no se degrade, diversas operaciones adicionales, tales como calentamiento y liofilización se pueden realizar tras el cultivo. Tales operaciones adicionales son preferentemente las que proporcionan una alta capacidad de supervivencia de células vivas. En el fármaco, producto alimenticio o bebida y pienso de la presente invención, las células de la cepa MCC1849 son preferentemente células vivas, aunque pueden ser células muertas.

La cepa MCC1849 se puede utilizar como un agente para promover la producción de IL-12. La cepa MCC1849, un agente para promover la producción de IL-12 que contiene la cepa, o una composición que contiene uno cualquiera de ellos, pueden utilizarse para un amplio intervalo de usos, por ejemplo, como fármaco, producto alimenticio o bebida, y pienso. Por ejemplo, puede proporcionarse un fármaco para promover la producción de IL-12, un producto alimenticio o bebida para promover la producción de IL-12 y un pienso para promover la producción de IL-12.

Además, el agente para promover la producción de IL-12 de la presente invención se puede utilizar como inmunoestimulante o agente antiviral. El virus como la diana del agente antiviral no está particularmente limitado siempre que la enfermedad causada por el virus pueda prevenirse o tratarse mediante la promoción de la producción

de IL-12 o inmunoestimulación, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, virus de la gripe.

El fármaco de la presente invención no está particularmente limitado siempre que la cepa MCC1849 esté contenida. Como el fármaco de la presente invención, puede utilizarse la cepa MCC1849 *per se* o puede prepararse una preparación farmacéutica de la misma mediante la adición de un vehículo líquido o sólido fisiológicamente aceptable, y utilizarse.

La forma de dosificación del fármaco de la presente invención no está particularmente limitada, y los ejemplos específicos incluyen comprimido, píldora, polvo, solución, suspensión, emulsión, gránulo, cápsula, jarabe, supositorio, inyección, pomada, parche, colirio, gotas nasales, etcétera. Además, para la preparación de una preparación farmacéutica, se pueden utilizar aditivos tales como un excipiente utilizado por lo general como un vehículo de preparación farmacéutica, aglutinante, agente disgregante, lubricante, estabilizador, saborizante, diluyente, tensioactivo y disolvente para inyección.

A pesar de que el contenido de la cepa MCC1849 en el fármaco de la presente invención se determina adecuadamente en función de la forma de dosificación, modo de empleo, edad del paciente, sexo, tipo de enfermedad, gravedad de la enfermedad, y otras condiciones, por lo general cae preferentemente en el intervalo de 1×10^6 a 1×10^{12} ufc/g, o 1×10^6 a 1×10^{12} ufc/ml, más preferentemente en el intervalo de 1×10^7 a 1×10^{11} ufc/g, o 1×10^7 a 1×10^{11} ufc/ml. Cuando las células de la cepa MCC1849 son células muertas, la unidad de ufc/g o ufc/ml puede reemplazarse con el número de células/g o el número de células/ml.

Además, siempre que el efecto de la presente invención no se degrade, el fármaco que contiene la cepa MCC1849 y otro fármaco, por ejemplo, un agente para promover la producción de IL-12, inmunoestimulante, agente antiviral, agente antiinflamatorio, agente antiulceroso, o similares distintos de la cepa MCC1849 pueden utilizarse en combinación.

El tiempo de administración del fármaco de la presente invención no está particularmente limitado, y puede ser adecuadamente elegido de acuerdo con el tipo de terapia para la enfermedad diana. El fármaco de la presente invención se puede administrar profilácticamente, o utilizarse para terapia de mantenimiento. La vía de administración se determina preferentemente de acuerdo con la forma de dosificación, edad del paciente, sexo, otras condiciones, gravedad de los síntomas del paciente, etcétera. En cualquier caso, el fármaco de la presente invención se puede administrar una o dos o más veces al día, o puede administrarse una vez en varios días o varias semanas.

El agente para promover la producción de IL-12 de la presente invención o una composición que lo contiene comprende células de la cepa MCC1849 como principio activo, y puede promover notablemente la producción de IL-12 en un cuerpo vivo. El aumento de IL-12 activa la inmunidad mediada por células. Por lo tanto, el agente para promover la producción de IL-12 de la presente invención puede potenciar la inmunidad mediada por células, y así, puede utilizarse también como inmunoestimulante. El término "inmunoestimulación" significa estimular varias inmunorreacciones, y es sinónimo de "activación inmune". Además, el agente para promover la producción de IL-12 también se puede utilizar como un agente para inducir la producción de IL-12.

El fármaco o agente para promover la producción de IL-12 de la presente invención tiene una acción para promover la producción de IL-12 o una acción de inmunoestimulación basada en la acción anterior, y se puede utilizar para un tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad que se puede prevenir o curar por la promoción de la producción de IL-12 o inmunoestimulación. El término "curar" también significa mejorar una enfermedad.

Los ejemplos específicos de la aplicación del fármaco de la presente invención incluyen, por ejemplo, mejoras de las alergias, tales como alergias alimentarias, asma bronquial, urticaria, rinitis, polinosis y choque anafiláctico, así como potenciación de la resistencia a enfermedades infecciosas, profilaxis del cáncer, prevención del avance del cáncer, etcétera. Además, el fármaco o agente para promover la producción de IL-12 de la presente invención puede ser ampliamente utilizado como agente antitumoral, agente profiláctico o terapéutico para una infección oportunista, o agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad alérgica.

El fármaco de la presente invención se puede administrar de forma independiente o puede ser utilizado junto con otro fármaco, tal como un inmunosupresor.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la cepa MCC1849 en la fabricación de un agente para promover la producción de IL-12 o un inmunoestimulante. Un aspecto adicional de la presente invención es un método para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad que es prevenible o curable por la promoción de la producción de IL-12, que comprende la etapa que consiste en administrar la cepa MCC1849 o el fármaco de la presente invención a un objeto de aplicación.

Como otra realización del fármaco de la presente invención, el fármaco de la presente invención se puede utilizar como agente antiviral, y, en particular, puede utilizarse como un agente antiviral para la gripe. El agente antiviral para la gripe de la presente invención se puede utilizar para un tratamiento profiláctico o terapéutico de una

enfermedad causada por un virus de la gripe. El agente antiviral para la gripe de la presente invención puede reducir la infección o la proliferación de un virus de la gripe en un cuerpo vivo. El virus como objeto del agente antiviral no está particularmente limitado, siempre que la enfermedad causada por el virus se pueda prevenir o curar mediante la promoción de la producción de IL-12 o inmunoestimulación.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la cepa MCC1849 en la fabricación de un agente antiviral, por ejemplo, un agente antiviral para la gripe. Otro aspecto adicional de la presente invención es un método para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad causada por un virus, por ejemplo, gripe, que comprende la etapa que consiste en administrar la cepa MCC1849 o el fármaco de la presente invención a un objeto de aplicación.

El producto alimenticio o bebida de la presente invención no está particularmente limitado siempre que la cepa MCC1849 esté contenida, y ejemplos del producto alimenticio o bebida incluyen bebidas, tales como refrescos, bebidas carbonatadas, bebidas nutritivas, bebidas de zumos de frutas y bebidas con bacterias de ácido láctico (incluyendo soluciones sin diluir concentradas o polvos para la preparación de estas bebidas); postres helados, tales como helados, sorbetes y hielo picado; golosinas, tales como caramelo duro, goma de mascar, caramelo, chicle, chocolate, productos de confitería en pastillas, aperitivos, galletas, gelatina, mermelada, crema y productos de confitería horneados; productos lácteos, tales como leche procesada, bebidas de leche, leche fermentada, yogur líquido y mantequilla; panes; productos alimenticios para la alimentación entérica, productos alimenticios líquidos, fórmulas infantiles, bebidas deportivas; otros productos alimenticios funcionales, etcétera. El producto alimenticio puede ser un suplemento en forma de, por ejemplo, comprimido. Cuando el producto alimenticio es un suplemento, la cepa MCC1849 puede tomarse sin verse influida por otros productos alimenticios en relación con la cantidad diaria de comidas y calorías ingeridas.

El producto alimenticio o bebida de la presente invención puede producirse mediante la adición de la cepa MCC1849 a una materia prima del producto alimenticio o bebida, y se puede producir de la misma manera que la de los productos alimenticios o bebidas habituales, excepto que se añade la cepa MCC1849. La cepa MCC1849 se puede añadir en cualquier etapa del proceso de fabricación del producto alimenticio o bebida. El producto alimenticio o bebida también se puede producir a través de un proceso de fermentación avanzado por la cepa MCC1849. Ejemplos de dicho producto alimenticio o bebida incluyen las bebidas con bacterias de ácido láctico, leches fermentadas, etcétera.

Como la materia prima del producto alimenticio o bebida, pueden ser utilizadas las materias primas utilizadas para la producción de bebidas y productos alimenticios habituales. El producto alimenticio o bebida producido se puede tomar oralmente.

El producto alimenticio o bebida de la presente invención incluye materias primas para la producción de productos alimenticios o bebidas y las que se añaden a productos alimenticios o bebidas en el transcurso del proceso de producción de productos alimenticios o bebidas o tras la producción, tales como aditivos alimentarios. Por ejemplo, la bacteria de ácido láctico de la presente invención puede ser utilizada como fermento para la producción de leche fermentada. La bacteria de ácido láctico de la presente invención también se puede añadir a una leche fermentada producida más tarde.

Aunque el contenido de la cepa MCC1849 en el producto alimenticio o bebida de la presente invención se determina apropiadamente de acuerdo con la forma del producto alimenticio o bebida, por lo general se encuentra preferentemente en el intervalo de 1×10^6 a 1×10^{12} ufc/g, o 1×10^6 a 1×10^{12} ufc/ml, más preferentemente en el intervalo de 1×10^7 a 1×10^{11} ufc/g, o 1×10^7 a 1×10^{11} ufc/ml, del producto alimenticio o bebida.

El producto alimenticio o bebida de la presente invención se puede utilizar para diversos usos que utilizan efectos de la promoción de la producción de IL-12, inmunoestimulación, antiviral, etcétera. Es decir, se puede proporcionar un agente para promover la producción de IL-12, un inmunoestimulante y un agente antiviral que contienen la bacteria de ácido láctico de la presente invención y se encuentran en forma de productos alimenticios o bebidas. El agente para promover la producción de IL-12, el inmunoestimulante y el agente antiviral en forma de un producto alimenticio o bebida son sinónimos de un agente para promover la producción de IL-12 que contiene el producto alimenticio o bebida de la presente invención, un inmunoestimulante que contiene el producto alimenticio o bebida de la presente invención, y un agente antiviral que contiene el producto alimenticio o bebida de la presente invención, respectivamente.

El producto alimenticio o bebida de la presente invención se puede vender como un producto alimenticio o bebida con la indicación de uso, es decir, para la promoción de la producción de IL-12, para la inmunoestimulación o para el antiviral. Además, el producto alimenticio o bebida de la presente invención puede tener una indicación tal como "para la promoción de la producción de IL-12", "para la inmunoestimulación", "para la activación inmune", "para el antiviral", "para el antiviral para la gripe" y "para la profilaxis de enfermedades infecciosas". Además, pueden utilizarse por supuesto indicaciones distintas de las descritas anteriormente que expresan un efecto obtenible de manera secundaria mediante la promoción de la producción de IL-12.

El término "indicación" antes mencionado incluye todas las acciones para informar a los consumidores sobre el uso

5 mencionado anteriormente, y cualquier indicación que recuerde o haga analogía del uso mencionado anteriormente cae dentro del alcance de la "indicación" de la presente invención independientemente del fin, contenido, artículo objetivo, medio, etc. de la indicación. No obstante, la indicación se efectúa preferentemente con una expresión que permite a los consumidores reconocer directamente el uso antes mencionado.

10 Los ejemplos específicos incluyen acciones que indican el uso mencionado anteriormente sobre las mercancías o paquetes de mercancías relacionados con los productos alimenticios o las bebidas de la presente invención, acciones de asignación, entrega, demostración para el fin de asignación o entrega, o importación de tales mercancías o paquetes de mercancías en los que se indica el uso mencionado anteriormente, demostración o

15 La indicación es preferentemente una indicación aprobada por la administración etc. (por ejemplo, una indicación en un formulario basado en una aprobación, que es calificado sobre la base de cualquiera de los diversos sistemas legales proporcionados por la administración). Ejemplos de la indicación incluyen además, por ejemplo, indicaciones de comida sana, productos alimenticios funcionales, productos alimenticios nutritivos entéricos, productos alimenticios para usos dietéticos especiales, productos alimenticios con alegaciones de función nutritiva, cuasi-fármacos, etcétera, así como las indicaciones aprobadas por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, por ejemplo, las indicaciones aprobadas sobre la base del sistema de productos alimenticios para usos sanitarios especificados y sistemas similares. Ejemplos de estos últimos incluyen indicaciones como productos alimenticios para usos sanitarios especificados, indicaciones como productos alimenticios para usos sanitarios especificados con alegaciones sanitarias calificadas, indicaciones de influencia sobre las estructuras y funciones corporales, indicaciones de reducción de alegaciones del riesgo de enfermedad, etcétera, y más específicamente, ejemplos típicos incluyen indicaciones como productos alimenticios para usos sanitarios especificados (especialmente indicaciones de uso para la salud) estipulados en las regulaciones de aplicación de la Ley de Promoción de la Salud (Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar Japonés, ordenanza ministerial n.º 86, 30 de abril de 2003) e indicaciones similares.

30 Ejemplos del pienso de la presente invención incluyen alimentos para mascotas, piensos para animales de granja, piensos para piscicultura, etcétera. El pienso de la presente invención puede producirse mezclando la cepa MCC1849 con un material de pienso común, por ejemplo, cereales, lías, salvado, harina de pescado, harina de huesos, aceite y grasa, leche desnatada en polvo, suero, piensos minerales y levadura. Además, el pienso puede producirse a través de un proceso de fermentación avanzado por la cepa MCC1849 como en el caso de, por ejemplo, ensilaje. El pienso producido se puede dar oralmente a mamíferos comunes, animales de granja, peces criados, animales domésticos, etcétera.

40 A pesar de que el contenido de la cepa MCC1849 en el pienso de la presente invención se determina apropiadamente de acuerdo con la forma del pienso, y el objeto al que se le da el pienso, generalmente se encuentra preferentemente en el intervalo de 1×10^6 a 1×10^{12} ufc/g, o 1×10^6 a 1×10^{12} ufc/ml, más preferentemente en el intervalo de 1×10^7 a 1×10^{11} ufc/g, o 1×10^7 a 1×10^{11} ufc/ml.

45 Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se explicará más específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos.

50 Ejemplo 1: Características bacteriológicas de la cepa MCC1849

La cepa MCC1849 se aisló de una muestra de heces humanas. Como las características bacteriológicas de la cepa, las relativas a la morfología celular, movilidad, esporulación, tinción de Gram, catalasa, producción de gas a partir de glucosa, y capacidad de fermentación del azúcar se muestran en la Tabla 1. La capacidad de fermentación del

60 Las características bacteriológicas se muestran en la Tabla 1. Sobre la base de estos resultados, se determinó que la cepa MCC1849 era *Lactobacillus paracasei*.

Tabla 1: Características bacteriológicas de la cepa de *Lactobacillus paracasei* MCC1849

1	Morfología celular	En bastón
2	Movilidad	Ninguna
3	Esporulación	Ninguna

4	Tinción de Gram	+
5	Catalasa	-
6	Producción de gas a partir de glucosa	-
7	Capacidad de fermentación del azúcar	
	(1) Control	-
	(2) Glicerol	-
	(3) Eritritol	-
	(4) D-arabinosa	-
	(5) L-arabinosa	-
	(6) D-ribosa	+
	(7) D-xilosa	-
	(8) L-xilosa	-
	(9) D-adonitol	-
	(10) Metil- β -D-xilopiranosido	-
	(11) D-galactosa	+
	(12) D-glucosa	+
	(13) D-fructosa	+
	(14) D-manosa	+
	(15) L-sorbose	-
	(16) L-ramnosa	-
	(17) Dulcitol	-
	(18) Inositol	-
	(19) D-manitol	+
	(20) D-sorbitol	+
	(21) Metil- α -D-manopiranosido	-
	(22) Metil- α -D-glucopiranosido	±
	(23) N-acetilglucosamina	±
	(24) Amigdalina	±
	(25) Arbutina	+
	(26) Citrato férrico esculina	+
	(27) Salicina	+
	(28) D-celobiosa	+
	(29) D-maltosa	+
	(30) D-lactosa	+
	(31) D-melibiosa	-
	(32) D-sacarosa	+
	(33) D-trehalosa	+
	(34) Inulina	+
	(35) D-melezitosa	+
	(36) D-rafinosa	-
	(37) Almidón	-
	(38) Glucógeno	-
	(39) Xilitol	-
	(40) Gentiobiosa	±
	(41) D-turanosa	+
	(42) D-lixosa	-
	(43) D-tagatosa	+
	(44) D-fucosa	-
	(45) L-fucosa	-
	(46) D-arabitol	-
	(47) L-arabitol	-
	(48) Gluconato	±
	(49) 2-cetogluconato	-
	(50) 5-cetogluconato	-

+: Positivo; -: Negativo; ±: Falso positivo

Además, sobre la base del análisis de la secuencia de nucleótidos del gen de ARNr 16S de la cepa MCC1849, se determinó que la cepa MCC1849 era *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus casei*. *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus casei* son especies estrechamente relacionadas, y se ha demostrado que la homología de las secuencias de nucleótidos del gen de ARNr 16S de las cepas convencionales de las mismas es del 99 % o superior (Huang C.H., y Lee F.L., Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 99 (2):319-27). Se determinó la secuencia del genoma de la cepa MCC1849, y la homología fue confirmada mapeando la lectura utilizando el genoma de la cepa convencional de *Lactobacillus paracasei* (ATCC 25302), o la cepa convencional de *Lactobacillus casei* (ATCC 393)

como el genoma de referencia.

Como resultado, la cepa MCC1849 mostró una homología del 85 % con respecto a la cepa convencional de *Lactobacillus paracasei*, mientras que mostró una homología del 45 % con respecto a la cepa convencional de *Lactobacillus casei*.

Por lo tanto, se confirmó que la cepa MCC1849 es *Lactobacillus paracasei*.

Ejemplo 2: Evaluación de la capacidad para inducir la producción de IL-12 utilizando células de bazo de ratón

El efecto de un tratamiento con RNasa o un tratamiento con enzimas que digieren la pared celular en la capacidad para inducir la producción de IL-12 de las bacterias de ácido láctico se evaluó mediante el uso de células de bazo de ratón para la cepa de *Lactobacillus paracasei* MCC1849 descrita en el Ejemplo 1, y la cepa de *Lactobacillus paracasei* FERM BP-11313 (publicación de patente internacional WO2012/133827), que es conocida por tener una alta capacidad para inducir la producción de IL-12, así como otras cepas de bacterias de ácido láctico, la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, la cepa de *Lactobacillus johnsonii* JCM 2012, la cepa de *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 y la cepa de *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842.

La cepa FERM BP-11313 se depositó como un depósito internacional en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación NITE (por sus siglas en inglés), Depositario de Microorganismos de Patentes. La cepa JCM 2012 y la cepa JCM 1149 están disponibles en el Instituto de Investigación Física y Química, una agencia administrativa independiente, Colección Japonesa de Microorganismos (JCM, por sus siglas en inglés) (2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama-ken, 351-0198). Además, la cepa ATCC 53103 y la cepa ATCC 11842 están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (dirección, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos de América).

Cada una de las cepas bacterianas de ácido láctico mencionada anteriormente se cultivó en medio MRS (de Man Rogosa Sharpe) (BD Company) durante 16 horas, y las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación y resuspensión en agua destilada, posteriormente se suspendieron en agua destilada a una densidad de 10 mg (en términos de peso seco de células)/ml, y se sometieron a un tratamiento térmico a 100 °C durante 15 minutos para obtener una suspensión de células muertas con bacterias de ácido láctico ("enzima sin tratar").

Cada suspensión de células muertas con bacterias de ácido láctico se centrifugó, se retiró el sobrenadante, los precipitados se suspendieron en un tampón Tris-malato 50 mM (pH 7,0) que contenía cloruro de magnesio 4 mM a una concentración de 10 mg (en términos de peso seco de células)/ml, a la suspensión se añadió N-acetil muramidasa (N-acetilmuramidasa SG, Seikagaku Corporation) a una concentración de 5 µg/ml, y la reacción se dejó a 37 °C durante 120 minutos. A continuación, se inactivó la enzima por un tratamiento térmico a 100 °C durante 5 minutos para obtener un producto tratado con enzimas que digieren la pared celular ("tratado con N-acetil muramidasa").

Además, se añadieron 0,1 mg/ml de ribonucleasa A (RNasa A, Life Technologies) a cada suspensión de células muertas con bacterias de ácido láctico, y se realizó un tratamiento enzimático a 37 °C durante 30 minutos. Después del tratamiento, los precipitados se lavaron 3 veces mediante centrifugación y resuspensión en agua destilada y, a continuación, se volvieron a suspender en agua destilada a una concentración de 10 mg (en términos de peso seco de células)/ml para obtener un producto tratado con RNasa ("tratado con RNasa").

Como los animales experimentales, se utilizaron ratones BALB/c de 7 semanas de vida (Japan SLC), y se diseccionaron a las 7 a 9 semanas de vida para extirpar sus bazos. Se recogieron células de bazo de los bazos extirpados, se trataron con una solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio 0,144 M, trishidroximetilaminometano 17 mM, pH 7,65) durante 2 minutos, y se centrifugaron para obtener células de bazo libres de la fracción de eritrocitos. Para estas células de bazo, y cada una de las suspensiones de células muertas con bacterias de ácido láctico (enzima sin tratar), el producto tratado con enzimas que digieren la pared celular (tratado con N-acetil muramidasa), y el producto tratado con RNasa (tratado con RNasa), que se prepararon anteriormente, un medio obtenido mediante la adición de SFB al 10 % (suero fetal bovino, Life Technologies), se añadieron 100 UI/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina a RPMI1640 (SIGMA-ALDRICH) para preparar soluciones de ensayo que contenían $2,5 \times 10^6$ células de bazo/ml y 5 µg (en términos de peso seco de células)/ml como la concentración final de la suspensión de células muertas con bacterias de ácido láctico, el producto tratado con enzimas que digieren la pared celular o el producto tratado con RNasa. Cada solución de ensayo se aplicó en un volumen de 200 µl a una microplaca de 96 pocillos (BD Company), y la incubación se realizó a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂.

Después de transcurrir 2 días, se recogió el sobrenadante del cultivo, y la concentración de IL-12 p70 (heterodímero p40-p35) en el sobrenadante del cultivo se midió utilizando un kit de medición (Mouse IL-12 p70 DuoSet, R&D Systems).

El ensayo se realizó por triplicado, y los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Fig. 1.

Tabla 2: Cantidad de IL-12 producida por células de bazo de ratón con bacterias de ácido láctico

Cepa	Cantidad de producción de IL 12- (pg/ml) (Media $\pm$ D.T.)		
	Enzima sin tratar	Tratado con N-acetil muramidasa	Tratado con RNasa
MCC1849	407,6 $\pm$ 35,3	436,7 $\pm$ 49,1	252,8 $\pm$ 25,0
FERM BP-11313	291,8 $\pm$ 42,6	15,7 $\pm$ 1,5	9,1 $\pm$ 1,8
ATCC 53103	148,5 $\pm$ 38,7	22,1 $\pm$ 2,9	8,5 $\pm$ 3,2
JCM 2012	101,3 $\pm$ 6,7	19,7 $\pm$ 6,8	17,5 $\pm$ 2,4
JCM 1149	63,3 $\pm$ 15,2	20,7 $\pm$ 2,2	14,5 $\pm$ 3,4
ATCC 11842	47,1 $\pm$ 1,0	8,7 $\pm$ 2,8	11,6 $\pm$ 5,2

La cepa de *Lactobacillus paracasei* MCC1849 mostró una capacidad para inducir la producción de IL-12 superior a la de la cepa FERM BP-11313, que es conocida por tener una alta capacidad para inducir la producción de IL-12. Las capacidades para inducir la producción de IL-12 de las otras cepas de bacterias de ácido láctico eran inferiores a las de las cepas mencionadas anteriormente.

Mediante el tratamiento con N-acetil muramidasa o el tratamiento con RNasa, las capacidades para inducir la producción de IL-12 de las cepas de bacterias de ácido láctico diferentes a la cepa MCC1849 se redujeron notablemente. Sin embargo, la cepa MCC1849 mantuvo la alta capacidad para inducir la producción de IL-12 incluso después de someterse a los tratamientos anteriormente mencionados. Puesto que la actividad para inducir la producción de IL-12 de la cepa FERM BP-11313, que es una cepa de la misma especie que la cepa MCC1849, fue degradada por el tratamiento con N-acetil muramidasa o el tratamiento con RNasa, se demostró que la estabilidad de la capacidad para inducir la producción de IL-12 de la cepa MCC1849 no es una propiedad dependiente de la especie, sino una propiedad específica de la cepa.

Ejemplo 3: Acción para prevenir la infección por virus de la gripe de la cepa MCC1849

La acción para prevenir la infección por virus de la gripe mediante la administración de la cepa MCC1849 se investigó por medio del uso de ratones.

La cepa MCC1849 se cultivó en el medio MRS durante 16 horas, las células se lavaron dos veces con agua destilada, y luego se suspendieron en agua destilada, se añadieron a la suspensión sacarosa y glutamato de sodio, y la mezcla se liofilizó. Las células liofilizadas se suspendieron en solución salina fisiológica a una densidad de 1×10^{10} ufc/ml para preparar una suspensión de células vivas de la cepa MCC1849.

La cepa MCC1849 se cultivó en el medio MRS durante 16 horas, las células se lavaron dos veces con PBS, y una vez con agua destilada, a continuación se suspendieron en agua destilada, y se sometieron a un tratamiento térmico a 100 °C durante 30 minutos. Después del tratamiento térmico, las células se lavaron dos veces con agua destilada, se suspendieron en agua destilada, y se liofilizaron. Las células liofilizadas se suspendieron en solución salina fisiológica a una concentración de 5 mg/ml para preparar una suspensión de células muertas de la cepa MCC1849.

Cada una de las suspensiones de células vivas (grupo vivo) de la cepa MCC1849, la suspensión de células muertas (grupo HK) de la misma, y la solución salina fisiológica (grupo de control) se administraron por vía oral en un volumen de 0,2 ml a ratones BALB/c durante 14 días, y después los ratones fueron infectados por un virus de la gripe (cepa A/PR8/34 (H1N1)) desde la cavidad nasal. Seis días después de la infección, se observaron los estados generales de los ojos (grado de apertura de los párpados y estado de los párpados), pelo (caída de pelo y piloerección), respiración (respiración irregular), y comportamiento (grado de comportamiento espontáneo) de los ratones, y los resultados de esos puntos fueron representados con las puntuaciones de acuerdo con los siguientes criterios para evaluar el estado de aparición de la enfermedad.

Estado normal: 0
Infección leve: 1
Infección moderada: 2
Infección grave: 3
Muerte: 4

La media de las puntuaciones de los puntos se utilizó como una puntuación de los síntomas para cada ratón individual.

Además, 6 días después de la infección, se extirparon los pulmones, y las concentraciones de virus en los pulmones se midieron por el método de ensayo de placas utilizando las células MDCK (células derivadas de riñón canino).

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3 y en la Fig. 2.

En comparación con el grupo de no administración de la cepa MCC1849 (grupo de control), la puntuación de los

síntomas se redujo significativamente, y la concentración de virus en los pulmones (título viral) también se redujo significativamente por la administración de una cualquiera de la suspensiones de células vivas de la cepa MCC1849 (grupo vivo) y la suspensión de células muertas de la cepa MCC1849 (grupo HK). Sobre la base de estos resultados, se demostró que la administración de la cepa MCC1849 tanto en el estado de células vivas como en el estado de células muertas es eficaz para la profilaxis de la infección por virus de la gripe.

5

Tabla 3: Acción para prevenir la infección por virus de la gripe de MCC1849

	Puntuación de los síntomas (Media $\pm$ D.T.)	Concentración de virus en el pulmón ($\times 10^3$ UFP) (Media $\pm$ D.T.)
Solución salina fisiológica (grupo de control)	1,31 $\pm$ 1,47	215,6 $\pm$ 109,4
Suspensión de células vivas (grupo vivo)	0,26 $\pm$ 0,41	47,7 $\pm$ 62,6
Suspensión de células muertas (grupo HK)	0,26 $\pm$ 0,41	24,8 $\pm$ 44,9

Aplicabilidad industrial

- 10 La cepa de la presente invención, la cepa *Lactobacillus paracasei* MCC1849, tiene una alta actividad para promover la producción de IL-12. La actividad para promover la producción de IL-12 de la cepa apenas se reduce por un tratamiento con enzimas que digieren la pared celular o un tratamiento con RNasa. Por lo tanto, se cree que las diferencias individuales de la actividad para promover la producción de IL-12 observada entre los objetos de la aplicación de la misma serían pequeñas, y por consiguiente la cepa es útil como inmunoestimulante. Además, la
- 15 cepa puede reducir la infección o la proliferación del virus de la gripe, etc., y se puede utilizar para tratamientos profilácticos y terapéuticos de enfermedades infecciosas, etcétera.

REIVINDICACIONES

1. La cepa de *Lactobacillus paracasei* MCC1849 (NITE BP-01633).
- 5 2. Un fármaco que contiene la cepa de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El fármaco de acuerdo con la reivindicación 2, que es para inmunoestimulación.
4. El fármaco de acuerdo con la reivindicación 2, que es para antivirüs.
- 10 5. El fármaco de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el virus es un virus de la gripe.
6. Un producto alimenticio o bebida que contiene la cepa de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 7. Un pienso que contiene la cepa de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Un agente para promover la producción de IL-12 que contiene la cepa de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 9. El agente para promover la producción de IL-12 de acuerdo con la reivindicación 8, que se encuentra en forma de producto alimenticio o bebida.

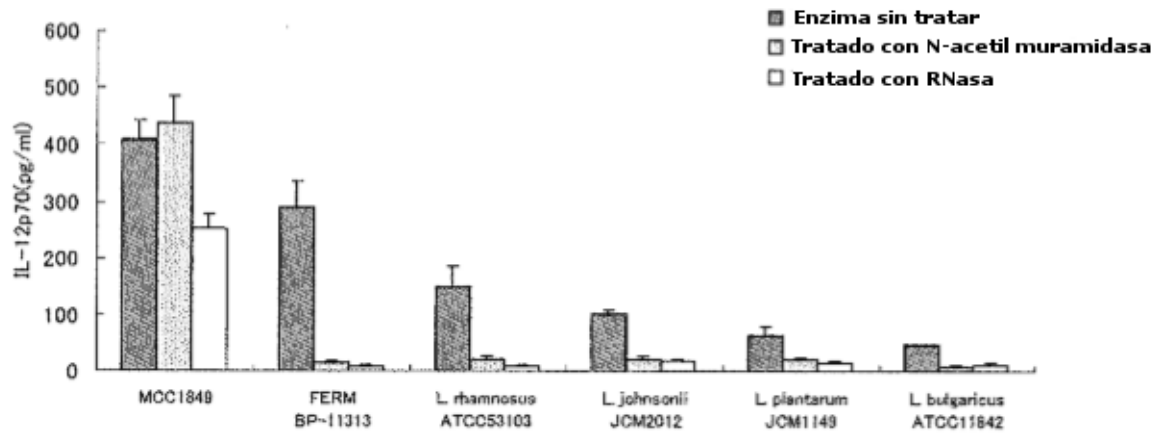


Fig. 1

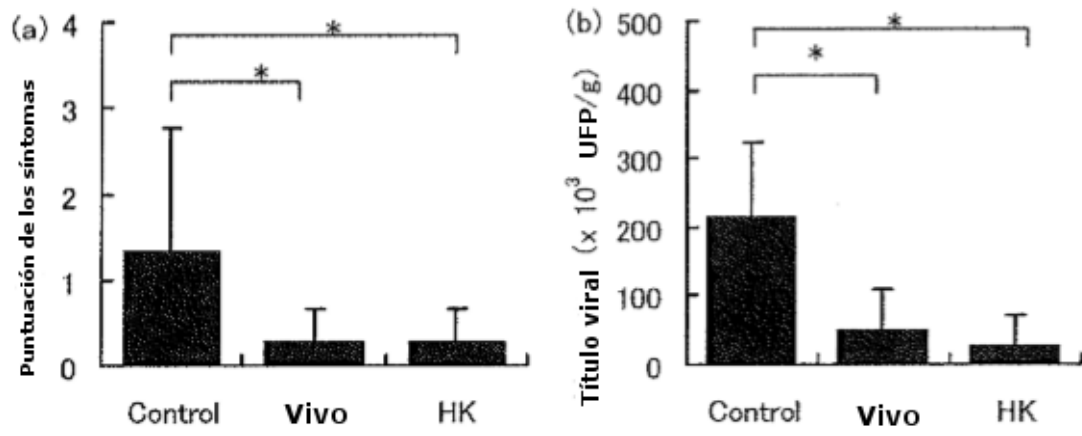


Fig. 2