(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 668 096**

(51) Int. Cl.:

A23C 9/00	(2006.01)
A61K 35/744	(2015.01)
A61K 35/747	(2015.01)
C12N 1/20	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
C12R 1/01	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2011 PCT/JP2011/080359**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12091081**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011 E 11853409 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2659898**

(54) Título: **Uso de bacterias de Lactococcus en el tratamiento o la prevención de infecciones virales**

(30) Prioridad:

28.12.2010 JP 2010293810

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2018

(73) Titular/es:

KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
Nakano Central Park South, 10-2, Nakano 4-chome, Nakano-ku
Tokyo 1640001, JP

(72) Inventor/es:

FUJIWARA DAISUKE;
JONAI KENTA y
SUGIMURA TETSU

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 668 096 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

Uso de bacterias de Lactococcus en el tratamiento o la prevención de infecciones virales

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a un agente para inducir la producción de interferón que contiene bacterias del ácido láctico y a un producto farmacéutico y a un producto alimenticio o de bebida que contiene el agente para inducir la producción de interferón.

Técnica antecedente

Las bacterias, incluyendo las bacterias del ácido láctico, se reconocen y engloban por un grupo de inmunocitos denominados sistema inmunitario innato, y provocan reacciones fisiológicas, tales como producción de citocinas o quimiocinas, cambios en la expresión génica y modificación de genes epigenéticos. Las células del sistema inmunitario innato pueden clasificarse de manera aproximada como macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK) y células dendríticas. En contraposición a las reacciones específicas de antígeno a largo plazo del sistema inmunitario adquirido, las reacciones del sistema inmunitario innato son reacciones de corta duración, no específicas de antígeno e inclusivas. El sistema inmunitario innato desempeña un papel clave en las respuestas primarias frente a la infección con bacterias o virus y, en particular, las células dendríticas son células constitutivas potentes y críticas. Las células dendríticas son altamente flexibles, existe un gran número de diferentes subespecies de las mismas, y estas células pueden clasificarse de manera aproximada en células dendríticas mieloides (mDC), células dendríticas CD8+ (DC CD8+) y células dendríticas plasmacitoides (pDC). Las mDC liberan principalmente citocinas inflamatorias, tales como interleucina-12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), tras la infección con bacterias e inducen la activación de linfocitos T auxiliares (linfocitos T CD4+). Las DC CD8+ son células de alta potencia que producen IL-12, que desempeñan un papel clave en la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) tras la infección con virus o sensibilización cruzada de antígenos de cáncer. Las pDC son células importantes que producen interferón de tipo I (IFN) que presentan actividad inhibidora del crecimiento frente a virus *in vivo*, y desempeñan un papel crítico en la biofilaxis antiviral. Los ejemplos representativos de interferón de tipo I incluyen IFN-α e IFN-β. Con el fin de inducir tales sustancias, es necesario estimular receptores de tipo Toll (TLR), en particular, TLR endosómicos, tales como TLR3, TLR7 o TLR9. En general, se conocen ARN bicatenario viral, ARN monocatenario viral o un agente antiviral (imidazoquinolina), y ADN CpG no metilado que comprende citosina y guanina unidas por un enlace fosfodiéster como ligando de TLR3, ligando de TLR7 y ligando de TLR9, respectivamente. Por tanto, se sabe que ácidos nucleicos de bacterias o virus sirven como ligandos en la inducción de la producción de interferón de tipo I. Se ha puesto IFN-α en uso práctico como agente terapéutico para hepatitis B, hepatitis C, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, cáncer renal y otras enfermedades, y se ha puesto IFN-β en uso práctico como agente terapéutico para esclerosis múltiple, además de hepatitis B y hepatitis C. Por consiguiente, se considera que pDC es la célula más importante desde el punto de vista de la biofilaxis, y la profilaxis antiviral, en particular. El IFN-γ es una citocina que se clasifica como interferón de tipo II, y lo producen principalmente linfocitos NK o Th1, aunque los efectos antivirales de la misma son débiles. Por consiguiente, una función principal de la misma se considera que es la potenciación de los efectos antivirales de IFN-α e IFN-β. Además, el IFN-λ descubierto más recientemente se clasifica como interferón de tipo III, una citocina de este tipo ha atraído la atención recientemente debido a sus potentes efectos antivirales verificados en los últimos años. El IFN-λ se produce principalmente por pDC en el organismo, como con el caso de IFN de tipo I.

Además de virus, se sabe que determinadas bacterias activan pDC o producen IFN-α. Como bacterias que se verifica que activan pDC, se ha notificado una de las bacterias que intoxican alimentos, *Staphylococcus aureus*. Como bacterias que potencian la producción de IFN-α en la sangre, se conocen bacterias patógenas, tales como *Chlamydia*, *Salmonella*, *Mycobacterium* y *Listeria*. Aunque se ha notificado que algunas bacterias del ácido láctico potencian la producción de IFN-α (véanse los documentos no de patente 1 y 2), la correlación de las mismas con pDC sigue sin conocerse, y nunca se ha realizado un cribado usando la capacidad de producción de IFN-α o activación de pDC como indicador. Además, se ha notificado que las bacterias del ácido láctico potencian la producción de IFN-β (véanse los documentos de patente 1 y 2 y el documento no de patente 3) y potencian la producción de IFN-γ (véase el documento de patente 3); sin embargo, la correlación de las mismas con pDC sigue sin conocerse. Aunque se ha notificado que el IFN-λ tiene actividad antiviral (véanse los documentos no de patente 4 y 5) y el IFN-λ se produce principalmente por pDC (documento no de patente 6), la correlación de IFN-λ con bacterias del ácido láctico sigue sin conocerse.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa JP (Saihyo) n.º 2009-005123 A

Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa JP (Saihyo) n.º 2009-005124 A

Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa JP (Kokai) n.º 2006-028047 A

Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa JP (Kokai) n.º 2001-46020 A

Documento de patente 5: Publicación de patente japonesa JP (Kokai) n.º 2000-262247 A

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Yuichiro Fukui, Nobuhiro Yajima: Abstracts for the Annual Meeting of the Japanese Association for Food Immunology, 2006 (del 23 al 24 de octubre de 2006)

Documento no de patente 2: “Shokuhin to Kaihatsu (Food Processing and Ingredients)”, vol. 42, n.º 5, 2007, págs. 85-87

Documento no de patente 3: Tadaomi Kawashima, Ikuko Nishimura: Abstracts for the Annual Meeting of the Japan Society for Lactic Acid Bacteria, 2010 (del 26 al 27 de julio de 2010)

Documento no de patente 4: Nature Immunology, 4: 69-77, 2002

Documento no de patente 5: Gastroenterology, 131: 1887-1898, 2006

Documento no de patente 6: Blood, 115: 4185-90, 2010

Documento no de patente 7: The Journal of Immunology, 186: 1685-1693, 2011

Documento no de patente 8: Journal of Leukocyte Biology 83: 296-304, 2008

Sumario de la invención

Objeto que va a lograrse mediante la invención

La presente invención pretende proporcionar tal como se reivindica un inductor de IFN capaz de inducir la producción de IFN que comprende, como principio activo, bacterias del ácido láctico, un agente inmunopotenciador o un agente profiláctico frente a la infección con virus que comprende tal inductor, y un producto alimenticio o de bebida que comprende tal inductor y que tiene actividad de inducción de IFN, actividad inmunopotenciadora o actividad profiláctica frente a la infección con virus.

Medios para lograr el objeto

Los presentes inventores construyeron un sistema de ensayo que implica el uso de activación de pDC como indicador y bacterias del ácido láctico seleccionadas que potenciarían la actividad profiláctica frente a la infección con virus a través de la ingestión de las mismas.

Como resultado, descubrieron que algunas bacterias del ácido láctico de forma esférica activarían pDC e inducirían la producción de interferón a partir de tales pDC. Descubrieron además que algunas bacterias del ácido láctico serían capaces de ejercer los efectos en un organismo incluso cuando se administran por vía oral. Los presentes inventores descubrieron que las bacterias del ácido láctico podrían usarse como agentes para inducir la producción de IFN, y tales bacterias también podrían usarse para la profilaxis frente a la infección con virus debido a la actividad inmunopotenciadora de un organismo. Esto ha conducido a la finalización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención es tal como sigue.

[1]. Un agente para su uso en un método de prevención o tratamiento de la infección con virus que comprende, como principio activo, bacterias del ácido láctico de forma esférica, en el que las bacterias del ácido láctico son *Lactococcus lactis JCM5805* o *Lactococcus lactis JCM20101*.

[2]. El agente según la reivindicación 1 para el uso según [1], que es una preparación oral.

[3]. Un producto alimenticio o de bebida que comprende una preparación oral para su uso tal como se definió en [2].

[4]. El producto alimenticio o de bebida para su uso según [3], que es un producto lácteo que contiene queso o yogur.

[5]. El producto alimenticio o de bebida para su uso según [3] o [4], que comprende las bacterias del ácido láctico a 10^7 células/g o más.

La presente divulgación también proporciona:

[1] Un agente para inducir la producción de IFN que comprende, como principio activo, bacterias del ácido láctico capaces de activar células dendríticas plasmacitoides (pDC) e inducir la producción de IFN o un producto cultivado de las mismas.

[2] El agente para inducir la producción de IFN según [1], en el que el producto procesado de bacterias del ácido láctico es una fracción que contiene ácidos nucleicos.

[3] El agente para inducir la producción de IFN según [1] o [2], en el que el IFN es IFN de tipo I o IFN de tipo III.

[4] El agente para inducir la producción de IFN según cualquiera de [1] a [3], en el que el IFN es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en IFN-α, IFN-β e IFN-λ.

[5] El agente para inducir la producción de IFN según cualquiera de [1] a [4], en el que, cuando el agente se administra por vía oral, las bacterias del ácido láctico capaces de activar células dendríticas plasmacitoides (pDC) e inducir la producción de IFN son altamente tolerantes al jugo gástrico o jugo intestinal y son capaces de alcanzar el canal intestinal vivas.

[6] El agente para inducir la producción de IFN según [5], en el que las bacterias del ácido láctico capaces de activar células dendríticas plasmacitoides (pDC) e inducir la producción de IFN son *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805.

[7] Un agente inmunopotenciador que comprende el agente para inducir la producción de IFN según cualquiera de [1] a [6].

[8] Un agente para la prevención o el tratamiento de la infección con virus que comprende el agente para inducir la producción de IFN según cualquiera de [1] a [6].

[9] El agente inmunopotenciador según [7], que es una preparación oral.

[10] El agente para la prevención o el tratamiento de la infección con virus según [8], que es una preparación oral.

[11] Un producto alimenticio o de bebida que comprende el agente para inducir la producción de IFN según cualquiera de [1] a [6].

[12] El producto alimenticio o de bebida según [11], que es queso o yogur.

[13] Un método de cribado de bacterias del ácido láctico capaces de activar células dendríticas plasmacitoides (pDC) e inducir la producción de IFN que comprende cultivar las bacterias del ácido láctico con células de médula ósea y detectar la activación de células dendríticas plasmacitoides (pDC) e inducción de la producción de IFN,

en el que, cuando se activan las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y se induce la producción de IFN, se determina que las bacterias del ácido láctico son capaces de activar células dendríticas plasmacitoides (pDC) e inducir la producción de IFN.

[14] Un microorganismo hospedador para una vacuna recombinante que comprende el agente para inducir la producción de IFN según cualquiera de [1] a [6].

Efectos de la invención

Tal como se describe en los ejemplos de la presente solicitud, el agente para inducir la producción de IFN que comprende, como principio activo, las bacterias del ácido láctico particulares de la presente invención es capaz de activar pDC e inducir la producción de interferón, tal como IFN-α, *in vitro* e *in vivo.* Como resultado de la inducción de la producción de interferón *in vivo*, se potencian las respuestas inmunitarias de un organismo, el organismo se protege frente a la infección con virus o similares, y podrían tratarse infecciones con virus. El inductor de IFN que comprende, como principio activo, bacterias del ácido láctico descrito anteriormente puede usarse como producto farmacéutico para potenciar respuestas inmunitarias para la prevención o el tratamiento de la infección con virus. Además, tal inductor puede usarse como componente de un producto alimenticio o de bebida para potenciar respuestas inmunitarias útiles para la prevención de la infección con virus.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra una lista de las bacterias del ácido láctico sometidas a prueba (parte 1).

La figura 1B muestra una lista de las bacterias del ácido láctico sometidas a prueba (parte 2).

La figura 1C muestra una lista de las bacterias del ácido láctico sometidas a prueba (parte 3).

La figura 2A muestra el número y la razón de bacterias del ácido láctico que producen IFN-α 50 pg/ml o más, cuando se comparan bacterias con forma de bacilo con bacterias de forma esférica.

La figura 2B muestra el número y la razón de bacterias del ácido láctico que producen IFN-α 100 pg/ml o más, cuando se comparan bacterias con forma de bacilo con bacterias de forma esférica.

La figura 3 muestra la microscopía electrónica de *Lactococcus lactis* JCM5805 (figura 3A) y *Lactococcus lactis* JCM20101 (figura 3B).

La figura 4 muestra las diferencias en el reconocimiento de bacterias del ácido láctico (captación) de pDC. La figura 4A, figura 4B y figura 4C muestran *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM21101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103, respectivamente.

La figura 5A muestra la cantidad de producción de IFN-α de diversas bacterias del ácido láctico.

La figura 5B muestra la cantidad de producción de IFN-β de diversas bacterias del ácido láctico.

La figura 5C muestra la cantidad de producción de IFN-γ de diversas bacterias del ácido láctico.

La figura 5D muestra la cantidad de producción de IFN-λ de diversas bacterias del ácido láctico.

La figura 6A muestra la capacidad de activación de pDC de bacterias del ácido láctico que tienen la capacidad de inducir la producción de IFN-α y los niveles de expresión de CMHII, CD40, CD80 y CD86.

La figura 6B muestra la capacidad de activación de pDC de bacterias del ácido láctico que tienen la capacidad de inducir la producción de IFN-α y los niveles de expresión de OX40L, PDL-1 e ICOS-L.

La figura 7 muestra la capacidad de estimulación de la producción de IFN-α de bacterias del ácido láctico en presencia de cualquiera o ambas de pDC y mDC.

La figura 8 muestra fotografías que muestran configuraciones de pDC cuando se añaden *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 al sistema de monocultivo de pDC. La figura 8A muestra los resultados referentes al control (al que no se añadieron bacterias del ácido láctico), la figura 8B muestra pDC cuando se añade *Lactococcus lactis* JCM5805, la figura 8C muestra pDC cuando se añade *Lactococcus lactis* JCM20101 y la figura 8D muestra pDC cuando se añade *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103.

La figura 9A muestra las cantidades de producción de IFN-α cuando se añaden *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 a las células pDC/mDC células generadas a partir de ratones deficientes en TLR2 y TLR4.

La figura 9B muestra las cantidades de producción de IFN-α cuando se añaden *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 a las células pDC/mDC generadas a partir de ratones deficientes en TLR7, TLR9 y MyD88.

La figura 10 muestra la capacidad de activación de IFN-α de ADN y ARN de *Lactococcus lactis* JCM5805 y *Lactococcus lactis* JCM20101.

La figura 11 muestra un resumen del diseño experimental que examina los efectos de la ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805 usando ratones sanos.

La figura 12 muestra los cambios en los niveles de IFN-α en sangre de ratones sanos que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 13A muestra los cambios en los niveles de CMH de clase II en pDC del bazo de ratones sanos que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 13B muestra los cambios en los niveles de CMH de clase II en pDC de los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones sanos que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 13C muestra los cambios en los niveles de CD86 en pDC del bazo de ratones sanos que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 13D muestra los cambios en los niveles de CD86 en pDC de los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones sanos que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 14 muestra un resumen de un método para la evaluación de *Lactococcus lactis* JCM5805 usando los modelos de inmunosupresión.

La figura 15A muestra los efectos de la ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805 usando los modelos de inmunosupresión con referencia a los cambios en los pesos corporales de modelos de ratón.

La figura 15B muestra los efectos de la ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805 usando los modelos de inmunosupresión con referencia a los cambios en los niveles de IFN-α en sangre de modelos de ratón.

La figura 16A muestra los cambios en los niveles de CMH de clase II en pDC de los modelos de ratón de inmunosupresión que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 16B muestra los cambios en los niveles de CD86 en pDC de los modelos de ratón de inmunosupresión que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 16C muestra el porcentaje de pDC en the modelos de ratón de inmunosupresión que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 16D muestra los resultados del análisis citométrico de flujo usando linfocitos de los modelos de ratón de inmunosupresión que habían ingerido *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 17 muestra *Lactococcus lactis* JCM5805 y una cepa equivalente a la misma (una cepa derivada de *Lactococcus lactis* JCM5805 y una cepa de la que se deriva *Lactococcus lactis* JCM5805).

La figura 18 muestra la capacidad de *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 vivos para la activación de IFN-α.

La figura 19A muestra el porcentaje de pDC determinado mediante análisis citométrico de flujo de la pureza de pDC humanas aisladas con MACS.

La figura 19B muestra la cantidad de producción de IFN-α detectada por medio de ELISA cuando se añade *Lactococcus lactis* JCM5805 a pDC humanas aisladas con MACS.

La figura 19C muestra la expresión génica de IFN-α1, IFN-β, IFN-λ1 y GAPDH detectada por medio de RT-PCR cuando se añade *Lactococcus lactis* JCM5805 a pDC humanas aisladas con MACS.

La figura 20A muestra una comparación de los cambios en la actividad de CMH de clase II en pDC del grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y del grupo de placebo.

La figura 20B muestra una comparación de los cambios en la actividad de CMH de clase II en pDC de un sujeto que tiene una alta actividad de CMH de clase II en el grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y en el grupo de placebo.

La figura 20C muestra una comparación de los cambios en la actividad de CMH de clase II en pDC de un sujeto que tiene una baja actividad de CMH de clase II en el grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y en el grupo de placebo.

La figura 20D muestra una comparación de los cambios en la actividad de CD86 en pDC del grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y del grupo de placebo.

La figura 20E muestra una comparación de los cambios en la actividad de CD86 en pDC de un sujeto que tiene una alta actividad de CMH de clase II en el grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y en el grupo de placebo.

La figura 20F muestra una comparación de los cambios en la actividad de CD86 en pDC de un sujeto que tiene una baja actividad de CMH de clase II en el grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y en el grupo de placebo.

La figura 21 muestra una comparación de las cantidades de transcripción génica de IFN-α1 en PBMC comparadas en la semana 0 y semana 4 tras el inicio de la prueba de un sujeto que tiene una baja actividad de CMH de clase II en el grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y en el grupo de placebo.

La figura 22 muestra una comparación de las cantidades de producción de IFN-α influidas por la estimulación de CpG en PBMC comparadas en la semana 0 y semana 4 tras el inicio de la prueba de un sujeto que tiene una baja actividad de CMH de clase II en el grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y en el grupo de placebo.

La figura 23 muestra los resultados de la comparación entre el grupo sometido a ingestión de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 y el grupo de placebo con respecto al desarrollo de síntomas de resfriado durante el periodo de ingestión de producto de prueba examinado cada semana.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación en el presenta documento, se describe la presente invención en detalle.

La presente divulgación se refiere a un agente para inducir la producción de IFN que comprende, como principio activo, bacterias del ácido láctico. El término "inducir (o variaciones del mismo) la producción de IFN" usado en el presente documento se refiere a la inducción de la producción de IFN *in vitro* e *in vivo.*

Las bacterias del ácido láctico que pueden usarse como agente para inducir la producción de IFN en la presente invención son capaces de activar células dendríticas plasmacitoides (pDC) y promover la producción de IFN de pDC. Además, las bacterias del ácido láctico que pueden usarse como agente para inducir la producción de IFN en la presente invención son capaces de promover la expresión de marcadores de activación, tales como CD80, CD86 y CMH de clase II, en pDC. Si las bacterias del ácido láctico candidatas tienen o no tales propiedades puede determinarse, por ejemplo, cultivando bacterias del ácido láctico candidatas en presencia de células de médula ósea generadas a partir de mamíferos, tales como ratones, y detectando la aparición de activación de pDC e inducción de la producción de IFN, tal como IFNα e IFNβ. El IFN puede someterse a ensayo midiendo la concentración de IFN en una disolución de cultivo por medio, por ejemplo, de ELISA. Las bacterias del ácido láctico que pueden usarse como agente para inducir la producción de IFN en la presente invención tienen una propiedad tal como se describe a continuación. Por ejemplo, se suspenden células de médula ósea de ratón de las que se han retirado los eritrocitos hasta una concentración de $5x10^5$ células/ml en medio RPMI (SIGMA) que contiene FCS al 10 % y β-mercaptoetanol 2 μM, se añade Flt-3L como citocina inductora de pDC hasta una concentración final de 100 ng/ml a la suspensión celular resultante, se cultiva el resultante en un incubador de CO_2 a 37 ºC en presencia del 5 % de CO_2, se añaden a lo mismo bacterias del ácido láctico 7 días después a 10 μg/ml, se recoge el sobrenadante de cultivo 48 horas después, se somete a ensayo la concentración de IFN-α en el sobrenadante de cultivo por medio de ELISA con el uso del kit de ensayo de IFN-α (PBL), y la concentración de IFN-α determinada es preferiblemente de 50 pg/ml o mayor, y más preferiblemente de 100 pg/ml o mayor.

Los ejemplos de bacterias del ácido láctico preferibles que pueden activar células dendríticas plasmacitoides (pDC) y promover la producción de IFN de pDC incluyen bacterias del ácido láctico de forma esférica. Específicamente, las bacterias del ácido láctico de forma esférica que pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* son más preferibles. Las cepas particularmente preferibles son *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. hordniae*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus damnosus* y *Streptococcus thermophiles.*

Los ejemplos específicos de tales bacterias del ácido láctico incluyen *Lactococcus garvieae* NBRC100934, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* JCM16167, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC100676, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM1180, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM11040, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC12007, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRIC1150, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM20101, *Leuconostoc lactis* NBRC12455, *Leuconostoc lactis* NRIC1540, *Pediococcus damnosus* JCM5886 y *Streptococcus thermophilus* TA-45. Entre estas cepas, la capacidad para inducir la producción de IFN-α de *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805 y la de *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM20101 son particularmente altas. Por tanto, el uso de *Lactococcus lactis* JCM5805 es particularmente preferible.

Las bacterias del ácido láctico que pueden usarse como agente para inducir la producción de IFN en la presente invención ejercen preferiblemente la actividad de inducción de IFN en un organismo cuando tales bacterias se ingieren por vía oral. Tales bacterias del ácido láctico son altamente tolerantes al jugo gástrico o intestinal. Por ejemplo, tales bacterias del ácido láctico tienen una tolerancia de alto nivel a los ácidos y son capaces de alcanzar el canal intestinal vivas. Cuando se ingiere por vía oral *Lactococcus lactis* JCM5805 descrita anteriormente, es capaz de ejercer un grado significativo de actividad para inducir la producción de IFN en un organismo.

Las bacterias del ácido láctico descritas anteriormente pueden obtenerse del RIKEN BioResource Center (3-1-1 Koyadai, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón), el Biological Resource Center (NBRC) en el National Institute of Technology and Evaluation (http://www.nbrc.nite.go.jp), el Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture (http://nodaiweb.university.jp/nric/) y DANISCO. Además, también pueden usarse cepas bacterianas equivalentes a las cepas, tales como *Lactococcus garvieae* NBRC100934, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* JCM16167,

Lactococcus lactis subsp. cremoris NBRC100676, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM1180, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM11040, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC12007, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRIC1150, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM20101, *Leuconostoc lactis* NBRC12455, *Leuconostoc lactis* NRIC1540, *Pediococcus damnosus* JCM5886 o *Streptococcus thermophilus* TA-45. Las cepas equivalentes incluyen cepas derivadas de las cepas bacterianas mencionadas anteriormente, las cepas bacterianas de las que se derivan las cepas mencionadas anteriores, o cepas descendientes de tales cepas bacterianas. Pueden conservarse cepas equivalentes en otras instituciones para la colección de cultivos. La figura 17 muestra cepas bacterianas derivadas de *Lactococcus lactis* JCM5805 y cepas bacterianas de las que se deriva *Lactococcus lactis* JCM5805. También pueden usarse cepas bacterianas equivalentes a *Lactococcus lactis* JCM5805 mostrada en la figura 17 como principios activos del agente para inducir la producción de IFN de la presente invención. El término "*Lactococcus lactis* JCM5805" usado en el presente documento también se refiere a tales cepas equivalentes. Otras bacterias del ácido láctico que pueden usarse como agente para inducir la producción de IFN de la presente invención pueden obtenerse de, por ejemplo, el RIKEN BioResource Center, la Colección Americana de Cultivos Tipo (EE.UU.), el Institute for Fermentation (2-17-85 Jusohonmachi, Yodogawa Ward, Osaka, prefectura de Osaka, Japón), o el Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture (1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya, Tokio, Japón).

El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención puede inducir cualquiera de interferón de tipo I (IFN de tipo I), interferón de tipo II (IFN de tipo II) o interferón de tipo III (IFN de tipo III). El IFN de tipo I es una citocina que es eficaz frente a la infección con virus, y los ejemplos del mismo incluyen IFN-α1, IFN-α2, IFN-α4, IFN-α5, IFN-α6, IFN-α7, IFN-α8, IFN-α10, IFN-α13, IFN-α14, IFN-α16, IFN-α17, IFN-α21 e IFN-β. Un ejemplo de IFN de tipo II es IFN-γ, y un ejemplo de IFN de tipo III es IFN-λ. El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención tiene actividad de inducción de la producción de IFN de tipo I, en particular. El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención activa células dendríticas plasmacitoides (pDC). Cuando se activa una célula dendrítica plasmacitoide, aparece un proceso celular, que es característico de la célula dendrítica activada, y se producen IFN de tipo I e IFN de tipo III. En este momento, las bacterias del ácido láctico, que son principios activos del agente para inducir la producción de IFN de la presente invención, se incorporan en las pDC. El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención tiene una alta capacidad para inducir la producción de IFN de tipo I e IFN de tipo III, y la capacidad para inducir la producción de IFN-α, que es IFN de tipo I, es particularmente alta. El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención también puede inducir la producción de IFN de tipo II, tal como IFN-γ, a partir de linfocitos NK o células Th1. La actividad inmunitaria de un organismo se potencia por medio de la inducción de la producción de IFN. Sin embargo, las bacterias del ácido láctico, que son principios activos del agente para inducir la producción de IFN de la presente invención, son capaces de inducir la expresión de PDL-1. El PDL-1 es un ligando de muerte programada-1 (PD-1), y PDL-1 se une a PD-1 e induce linfocitos T reguladores, de modo que PDL-1 puede impedir que un sistema inmunitario se active excesivamente y suprimir las reacciones autoinmunitarias. Específicamente, el agente para inducir la producción de IFN de la presente invención no sólo es capaz de inducir la producción de IFN y activar las funciones inmunitarias de un organismo, sino que también es capaz de suprimir reacciones inmunitarias excesivas y mantener las reacciones inmunitarias equilibradas en el organismo.

El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención puede inducir simultáneamente la producción de IFN de tipo I e IFN de tipo III. Específicamente, la producción de IFN-α, IFN-β e IFN-λ puede inducirse simultáneamente.

El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención promueve la expresión de CD80, CD86 y CMH de clase II en pDC. El TLR9 está implicado en la inducción de la producción de IFN como receptor.

El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención contiene un producto de cultivo de las bacterias del ácido láctico anteriores. El término "producto de cultivo" se refiere a bacterias vivas, bacterias muertas, bacterias vivas o muestras fragmentadas, bacterias vivas o muertas liofilizadas, o un producto fragmentado, disolución de cultivo o extracto de cultivo de tales bacterias liofilizadas. El término también se refiere a parte de las bacterias del ácido láctico o bacterias del ácido láctico tratadas. Los ejemplos de bacterias del ácido láctico tratadas incluyen productos que resultan del tratamiento enzimático o térmico de bacterias del ácido láctico y productos recuperados a través de la precipitación con etanol de los productos del tratamiento enzimático o térmico. Además, el ADN o ARN de las bacterias del ácido láctico anteriores está dentro del alcance del producto de cultivo de bacterias del ácido láctico. El ADN o ARN de las bacterias del ácido láctico anteriores se considera capaz de activar pDC e inducir la producción de IFN.

Las bacterias del ácido láctico pueden cultivarse según una técnica convencional usando medios convencionales. Los ejemplos de medios que pueden usarse incluyen medios MRS, GAM y LM17, y pueden añadirse a los mismos sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, antibióticos, sueros u otras sustancias, según se necesite. El cultivo puede llevarse a cabo a de 25 ºC a 40 ºC durante de varias horas a varios días.

Tras el cultivo, las bacterias del ácido láctico se recogen por medio de centrifugación, filtración u otros medios. Cuando se usan en forma de bacterias muertas, las bacterias pueden esterilizarse e inactivarse con el uso de un

autoclave, por ejemplo.

La actividad para inducir la producción de IFN de bacterias del ácido láctico que pueden usarse como principios activos del agente para inducir la producción de IFN de la presente invención puede someterse a ensayo cultivando bacterias candidatas, cultivando células productoras de IFN en presencia del producto de cultivo de las mismas y detectando un aumento en la cantidad de IFN producida por las células productoras de IFN. Normalmente, se usan bacterias liofilizadas. El peso de las bacterias en el producto de liofilización se ajusta a de 0,1 a 5 mg/ml, y el producto de liofilización se cultiva entonces con, por ejemplo, células de médula ósea. Los orígenes de células de médula ósea no están particularmente limitados, y pueden usarse células de médula ósea derivadas de seres humanos o células de médula ósea derivadas de animales no humanos tales como ratones. Cuando se activan pDC y se induce la producción de IFN en las células de médula ósea, puede determinarse que las bacterias del ácido láctico van a poder usarse como principios activos del agente para inducir la producción de IFN de la presente invención. La activación de pDC puede detectarse, por ejemplo, sometiendo a ensayo la activación de marcadores de pDC, y los ejemplos de marcadores de activación incluyen CD80, CD86 y CMH de clase II. Tales marcadores de activación pueden someterse a ensayo por medio de tinción celular o citometría de flujo usando anticuerpos que reaccionan con tales marcadores. Los ejemplos de IFN incluyen IFN de tipo I tales como IFN-α e IFN-β, IFN de tipo II tales como IFN-γ e IFN de tipo III tal como IFN-λ. Entre ellos, son preferibles IFN de tipo I e IFN de tipo III, el IFN de tipo I es más preferible y el IFN-α es adicionalmente preferible. La inducción de la producción de IFN puede someterse a ensayo determinando la cantidad de IFN en un medio en el sistema de cultivo por medio, por ejemplo, de ELISA.

La presente divulgación incluye un método para cribar bacterias del ácido láctico que tienen actividad de inducción de la producción de IFN y que pueden usarse como principios activos del agente para inducir la producción de IFN de la presente invención.

El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención puede usarse en forma de un producto farmacéutico que induce la producción de IFN y potencia la actividad inmunitaria de un organismo. Específicamente, el agente para inducir la producción de IFN puede usarse en forma de un agente inmunopotenciador o inmunoestimulador. Tales productos farmacéuticos pueden usarse para agentes preventivos o terapéuticos para enfermedades, que ya se sabe que están asociadas con IFN de tipo I. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen: cáncer, incluyendo cáncer renal, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica, tricoleucemia, gliosarcoma, meduloblastoma, astroglioma, melanoma maligno, micosis fungoide y leucemia de linfocitos T adultos; infección con virus, incluyendo panencefalitis esclerosante subaguda, mielopatía asociada a VLTH-1, hepatitis B y hepatitis C; infección con bacterias, tales como *Chlamydia* (enfermedad de transmisión sexual), *Mycobacteriaceae* (tuberculosis), listeriosis (icoremia), *Staphylococcus* (intoxicación alimentaria) y *Helicobacter* (gastritis); y enfermedades autoinmunitarias incluyendo esclerosis múltiple. El producto farmacéutico es particularmente útil como agente profiláctico o terapéutico para la infección con virus. Puesto que la función de inhibición de la diferenciación de osteoblastos en osteoclastos se conoce como actividad de IFN de tipo I, puede usarse como agente preventivo o terapéutico para osteoporosis.

Un antígeno asociado con una enfermedad particular puede expresarse en bacterias del ácido láctico de forma esférica, que es el inductor de IFN de la presente invención, por medio de ingeniería genética, y el resultante puede usarse como vacuna. Puesto que la pared celular de las bacterias del ácido láctico puede proteger a los antígenos frente al ácido gástrico, tales cepas bacterianas que expresan antígenos foráneos son particularmente preferibles como organismos hospedadores de vacunas orales. En general, las vacunas se clasifican como vacunas vivas, vacunas de partículas completas inactivadas, o vacunas divididas. Sin embargo, las vacunas vivas representan un riesgo de potenciación de la virulencia del virus, las vacunas de partículas completas inactivadas pueden provocar efectos secundarios debido a la presencia de impurezas, y las vacunas divididas con la mayor seguridad son problemáticas en cuanto a la eficacia. Con el fin de superar tales desventajas, se ha intentado el desarrollo de vacunas recombinantes que expresan selectivamente antígenos diana. Si los antígenos diana se expresan en las bacterias del ácido láctico de forma esférica que tienen los efectos de inducción de IFN según la presente invención, también pueden lograrse los efectos de un adyuvante, y es por tanto muy útil.

Las formas de dosificación el agente para inducir la producción de IFN de la presente invención no están particularmente limitadas. Los ejemplos incluyen polvo, gránulos, comprimidos, jarabe, preparaciones de inyección, gotas, fármacos en polvo, supositorios, suspensiones y pomadas. El producto farmacéutico de la presente invención puede administrarse por vía oral o por vía parenteral a través de inyección intravenosa, inyección intramuscular, administración subcutánea, administración rectal o administración transdérmica, siendo la administración oral preferible. El agente para inducir la producción de IFN puede contener un excipiente, un disgregante, un aglutinante, un lubricante, un colorante, o similar. Los ejemplos de excipientes incluyen glucosa, lactosa, almidón de maíz y sorbitol. Los ejemplos de disgregantes incluyen almidón, alginato de sodio, gelatina en polvo, carbonato de calcio, citrato de calcio y dextrina. Los ejemplos de aglutinantes incluyen dimetilcelulosa, poli(alcohol vinílico), poli(vinil éter), metilcelulosa, etilcelulosa, goma arábiga, gelatina, hidroxipropilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los ejemplos de lubricantes incluyen talco, estearato de magnesio, polietilenglicol y aceite vegetal hidrogenado. La dosis puede determinarse adecuadamente según la edad, el peso corporal o el sexo de un paciente, el tipo de enfermedad, la gravedad de los síntomas, u otras condiciones. El agente puede administrarse una vez o varias veces diferenciadas

al día, y puede administrarse un producto de cultivo en una cantidad equivalente a de 1 x 10^9 a 1 x 10^{12} células en un único caso. Como alternativa, la dosis puede ser de 1 a 1.000 mg de bacterias del ácido láctico.

El agente para inducir la producción de IFN de la presente invención puede incorporarse en un producto alimenticio o de bebida. Por tanto, el producto alimenticio o de bebida resultante puede usarse para la inducción de la producción de IFN, inmunopotenciación, inmunoestimulación, profilaxis frente a la infección con virus, u otros propósitos. Los productos alimenticios o de bebida objetivo no están particularmente limitados, siempre que no se inhiban los principios activos para la inducción de la producción de IFN. Los ejemplos incluyen leche, productos lácteos, bebidas, condimentos, bebidas alcohólicas, productos agrícolas, productos forestales procesados, dulces, panes, cereales, fideos, productos de marisco, productos de ganadería procesados, aceites y grasas, aceites y grasas procesados, alimentos congelados preparados, alimentos envasados y esterilizados en bolsas, alimentos listos para comer y materiales alimenticios. El uso de productos lácteos fermentados, tales como yogur o queso, y bebidas que contienen bacterias del ácido láctico es particularmente adecuado. Cuando se usan en forma de productos de alimentos o bebidas fermentados, pueden añadirse cantidades dadas de bacterias del ácido láctico muertas que tienen actividad de inducción de la producción de IFN a productos alimenticios o de bebida fermentados. Como alternativa, tales bacterias del ácido láctico pueden usarse como iniciadores para producir productos alimenticios o de bebida fermentados.

También puede usarse una fracción que contiene grandes cantidades de ácidos nucleicos de las bacterias del ácido láctico de la presente divulgación como agente para inducir la producción de IFN. Un ácido nucleico puede ser ADN, ARN o una mezcla de los mismos, siendo preferible ADN. Tal fracción puede prepararse mediante, por ejemplo, tratamiento enzimático o térmico (documento de patente 4) o recuperación de un precipitado obtenido con la ayuda de etanol (documento de patente 5). En la presente divulgación, tal fracción se denomina producto procesado de bacterias del ácido láctico. Con el uso de tal fracción, puede proporcionarse un producto alimenticio o de bebida con principios activos enriquecidos más eficaz para la salud.

Los ejemplos del producto alimenticio o de bebida de la presente invención incluyen un producto alimenticio o de bebida saludable, un producto alimenticio o de bebida para uso saludable especificado, un producto alimenticio o de bebida con reclamaciones de función nutritiva y un producto alimenticio o de bebida de complemento alimenticio. El término “producto alimenticio o de bebida para uso saludable especificado” se refiere a un producto alimenticio o de bebida que va a ingerirse para objetivos sanitarios especificados y tiene un etiquetado que indica los objetivos que pueden esperarse a través de la ingestión del mismo. Tal producto alimenticio o de bebida puede proporcionarse con un etiquetado que indica, por ejemplo, la potenciación de las funciones inmunitarias del organismo, la estimulación de las funciones inmunitarias del organismo, la disminución de la susceptibilidad a resfriados, la potenciación de la tolerancia a la infección con virus tales como virus de la gripe, norovirus o rotavirus, o prevención del cáncer.

Ejemplos

La presente invención se describe en detalle con referencia a los siguientes ejemplos, aunque la presente invención no se limita a estos ejemplos.

[Ejemplo 1]

Preparación de bacterias del ácido láctico de prueba

<Método experimental>

Las bacterias del ácido láctico mostradas en la figura 1A, la figura 1B y la figura 1C se sometieron a tratamiento térmico para preparar bacterias del ácido láctico muertas. Al principio, las bacterias del ácido láctico mencionadas anteriormente se adquirieron de colecciones de cepas microbianas en Japón y el extranjero. Se obtuvieron las bacterias del ácido láctico de la Colección Japonesa de Microorganismos (JCM) del RIKEN BioResource Center, el Culture Collection Center del Institute of Fermentation, Osaka (IFO), el NODAI Culture Collection Center (NRIC) de la Tokyo University of Agriculture, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, EE.UU.), y DANISCO. Se obtuvieron un total de 125 cepas de 31 especies diferentes. Se sometieron las bacterias del ácido láctico a cultivo estacionario en medio MRS, GAM o LM17 a 30 ºC o 37 ºC durante de 24 a 48 horas. Se recogieron las cepas, se lavaron tres veces con agua estéril y luego se desinfectaron en un autoclave a 100 ºC durante 30 minutos. Después de eso, se liofilizaron las cepas, y se ajustó la concentración a 1 mg/ml con PBS (Takara Bio).

[Ejemplo 2] Cribado de bacterias del ácido láctico que tienen capacidad para inducir la producción de IFN-α

Se evaluó la capacidad de las bacterias del ácido láctico preparadas en el ejemplo 1 para inducir la producción de IFN-α con referencia a la activación de pDC.

<Método experimental>

Se recogieron células de médula ósea de los huesos femorales de ratones C57BL/6 según una técnica convencional, y se retiraron los eritrocitos de las mismas. Posteriormente, se suspendieron las células de médula ósea recogidas hasta una concentración de $5x10^5$ células/ml en medio RPMI (SIGMA) que contenía FCS al 10 % y β-mercaptoetanol 2 μM. Se añadió Flt-3L (R&D Systems) como citocina inductora de pDC hasta una concentración final de 100 ng/ml a la suspensión celular resultante, y se realizó el cultivo en un incubador de CO_2 a 37 ºC en presencia del 5 % de CO_2. Se añadieron al mismo diversos tipos de bacterias del ácido láctico 7 días después a 10 μg/ml, y se recogió el sobrenadante de cultivo 48 horas después. Se sometió el sobrenadante de cultivo a ensayos ELISA con el uso del kit de ensayo de IFN-α (PBL).

<Resultados>

La figura 2 muestra cepas que se evaluó que eran capaces de producir IFN-α 50 pg/ml o más por medio de ELISA. Entre las 125 cepas sometidas a prueba, se observó actividad en sólo 13 cepas (es decir, *Lactococcus garvieae* NBRC100934, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* JCM16167, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NBRC100676, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM1180, *Lactococcus lactis subsp. hordniae* JCM11040, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NBRC12007, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRIC1150, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM20101, *Leuconostoc lactis* NBRC12455, *Leuconostoc lactis* NRIC1540, *Pediococcus damnosus* JCM5886 y *Streptococcus thermophilus* TA-45). Había sólo 3 cepas (es decir, *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRIC1150, *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM5805 y *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM20101) que se había evaluado que eran capaces de producir IFN 100 pg/ml o más. La mayoría de las bacterias no tenían la capacidad de inducir la producción de IFN-α en pDC. Esto indica que tal actividad no es universal entre los diversos tipos de bacterias del ácido láctico.

Las 3 cepas seleccionadas que inducen la producción de IFN a un alto nivel (es decir, IFN 100 pg/ml o más) eran bacterias de forma esférica clasificadas como *Lactococcus lactis subsp. lactis.* Tal como se muestra en la figura 2A, además, la tasa de acierto de bacterias del ácido láctico de forma esférica es del 34,29 %, que es significativamente superior a la de bacterias del ácido láctico con forma de bacilo (es decir, 0,00 %). En el caso de cepas que inducen la producción de IFN a un alto nivel mostradas en la figura 2B, la tasa de acierto de bacterias del ácido láctico de forma esférica es del 8,57 %, que es también superior a la de bacterias del ácido láctico con forma de bacilo (es decir, 0,00 %). Esto indica que la actividad de estimulación de pDCs para inducir la producción de IFN-α es característica de bacterias del ácido láctico de forma esférica. Aunque se notificó actividad de estimulación directa de pDC por *Staphylococcus aureus*, se descubrió por primera vez la capacidad de activación de pDC de bacterias ingeribles que son inocuas para seres humanos.

Las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 que presentan la capacidad para inducir la producción de IFN-α a un nivel particularmente significativo y, como control negativo, la cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 con forma de bacilo se sometieron al siguiente análisis.

La figura 3 muestra micrografías electrónicas de las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101. La figura 3A muestra la cepa JCM5805, y la figura 3B muestra la cepa JCM20101. Estas cepas eran bacterias de forma ovalada con ejes principales de aproximadamente 1 μm y ejes secundarios de 0,5 μm. Puesto que las bacterias con forma de bacilo tienen generalmente ejes secundarios de aproximadamente 1 μm y ejes principales de 3 μm, puede decirse que tales bacterias son muy pequeñas.

[Ejemplo 3]

Diferencias en el reconocimiento (captación) de bacterias del ácido láctico por pDC

Con el uso de las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101, que se encontró que eran bacterias del ácido láctico que activaban pDC en el ejemplo 2, y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 como control negativo, se llevó a cabo un experimento para confirmar que la actividad dependería del reconocimiento de las bacterias por pDC; es decir, la captación de las bacterias.

<Método experimental>

En el ejemplo 2, se cultivaron células de médula ósea colocando un microportaobjetos de vidrio (Matsunami Glass Ind., Ltd.). Se añadieron al mismo *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 marcadas con FITC (SIGMA), y se realizó el cultivo en un incubador de CO_2 a 37 ºC en presencia del 5 % de CO_2 durante 3 horas. Después de eso, se recogió el microportaobjetos de vidrio. Se tiñeron las células con anticuerpo anti-B220-PE-Cy5.5 (eBiosciencs), se permitió que se adhirieran a los portaobjetos de vidrio (Matsunami Glass Ind., Ltd.) y luego se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus Corporation).

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 4. La figura 4A, figura 4B y figura 4C muestran *Lactococcus lactis* JCM5805,

la cepa *Lactococcus lactis* JCM21101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103, respectivamente. Las células rojas positivas para B220 son pDC. En las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101, se observa captación de las bacterias del ácido láctico teñidas de verde dentro de las células, aunque *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 no se incorpora en las células. Por lo tanto, se considera que si se produce o no actividad depende del reconocimiento de bacterias por pDC.

[Ejemplo 4]

Actividad de bacterias del ácido láctico en cuanto a capacidad para inducir la producción de IFN

Se examinó la capacidad de las bacterias del ácido láctico que tienen la capacidad de inducir la producción de IFN-α para producir citocinas de otros tipos.

<Método experimental>

Los productos muertos y liofilizados (10 μg/ml) de *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 y, como controles positivos, TLRL conocidos; es decir, Pam3CSK4 (TLR2L, 1 μg/ml, InvivoGen), LPS (TLR4L, 5 ng/ml, SIGMA-ALDRICH) y ADN CpG (TLR9L, 0,1 μM, InvivoGen), se añadieron al sistema de cultivo de pDC/mDC descrito en el ejemplo 2, y se recuperó el sobrenadante de cultivo 48 horas después. Se sometió el sobrenadante de cultivo a ensayos ELISA usando el kit de ensayo de IFN-α (PBL), el kit de ensayo de IFN-β (PBL), el kit de ensayo de IFN-γ (BD Pharmingen) y el kit de ensayo de IL-28/IFN-λ (eBiosciencs).

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 5A a la figura 5D. La figura 5A, figura 5B, figura 5C y figura 5D muestran los resultados referentes a IFN-α, IFN-β, IFN-γ e IFN-λ, respectivamente. Tal como se describió en el ejemplo 2, se observó la capacidad de producción de IFN-α en *Lactococcus lactis* JCM5805 y en *Lactococcus lactis* JCM20101, y el título del mismo era equivalente al de ADN CpG (ODN 1585) (es decir, TLR9L, 0,1 μM). Con respecto a IFN-β, que es también IFN de tipo I, se observó la capacidad selectivamente en las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101. Con respecto a IFN-γ, que es IFN de tipo II, todas las cepas bacterianas ejercieron la capacidad de inducción de la producción, aunque el grado de la misma variaba entre las especies bacterianas. Con respecto a IFN-γ, que es IFN de tipo III, se observó inducción selectivamente en *Lactococcus lactis* JCM5805 y en *Lactococcus lactis* JCM20101.

Aunque se sabe que el nivel de IFN-λ inducido por genes estimulados por IFN (ISG) es inferior al de IFN-α o IFN-β, se sabe que el IFN-λ potencia sus efectos antivirales en coordinación con IFN-α (documento no de patente 5). Puesto que las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 son capaces de inducir la producción de todos los IFN de tipo I, tipo II y tipo III, se considera que estas cepas tienen una actividad antiviral muy fuerte.

[Ejemplo 5]

Actividad de bacterias del ácido láctico en cuanto a activación de pDC

Se examinó la capacidad de bacterias del ácido láctico que tienen la capacidad de inducir la producción de IFN-α para la activación de pDC.

<Método experimental>

Se tiñeron las células cultivadas en el ejemplo 3 durante 30 minutos a 4 ºC con el uso de anticuerpo anti-CD11b-APC-Cy7 (BD Pharmingen), anticuerpo anti-B220-PerCP (BD Pharmingen) y anticuerpo anti-CD11c-PE-Cy7 (eBiosciencs) para la clasificación de pDC, anticuerpo anti-CMH de clase II-FITC (eBiosciencs), anticuerpo anti-CD40-FITC (eBiosciencs), anticuerpo anti-CD80-APC (eBiosciencs) y anticuerpo anti-CD86-APC (eBiosciencs) como indicadores de activación, y anticuerpo anti-OX40L-PE (eBiosciencs), anticuerpo anti-PDL-1-PE (eBiosciencs) y anticuerpo anti-ICOS-L-PE (eBiosciencs) como marcadores inhibidores. Se lavaron las células y luego se analizaron con el uso de FACS Canto II (BD).

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 6A y en la figura 6B. La figura 6A muestra los niveles de expresión de CMHII, CD40, CD80 y CD86, y la figura 6B muestra los niveles de expresión de OX40L, PDL-1 e ICOS-L. Los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) logrados sin la adición de bacterias del ácido láctico se muestran encima, y los valores de MFI logrados con la adición de bacterias del ácido láctico se muestran debajo. Según los marcadores de activación, se observó potenciación con la adición de cualquier bacteria del ácido láctico. La mayor diferencia entre las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 y la cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 que no tiene capacidad de inducción de la producción de IFN-α se observa en CD28, que es una molécula

reguladora de la actividad de linfocitos T, y ligandos de CTLA-4 (es decir, CD80 y CD86). Los niveles de expresión se potenciaron significativamente mediante las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101. Según los marcadores inhibidores, se observó un aumento en los niveles de expresión con la adición de bacterias del ácido láctico, tal como se esperaba. En particular, se activó significativamente la expresión de PDL-1 mediante las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101.

Tal como se describió anteriormente, las pDC estimuladas por las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 producen IFN-α, potenciando de ese modo el sistema inmunitario. Sin embargo, el sistema inmunitario potenciado puede provocar enfermedades autoinmunitarias como efectos secundarios. El PDL-1, que se confirmó que se inducía tras la estimulación mediante las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 en esta prueba, se sabe que se une a PD-1 de linfocitos T induciendo un linfocito T regulador. Específicamente, se considera que las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 son capaces de mantener el sistema inmunitario en un estado bien equilibrado al tiempo que evitan que se active excesivamente a través de la expresión de PDL-1, además de la potenciación del sistema inmunitario a través de la producción de IFN-α.

[Ejemplo 6]

Capacidad para estimular la producción de IFN-α de bacterias del ácido láctico en presencia de cualquiera o ambas de pDC y mDC

En el ejemplo 2, se seleccionaron las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 basándose en la actividad para inducir la producción de IFN-α. En el sistema de cultivo usado para los ensayos, se desarrollan células dendríticas mieloides (mDC), además de pDCs (es decir, el denominado sistema de cultivo mixto de pDC/mDC). Se considera que las interacciones pDC-mDC son críticas en un organismo. Por ejemplo, se ha notificado la conversión de pDC en mDC tras la infección con virus. Por consiguiente, se examinaron los efectos de la adición de bacterias del ácido láctico en el sistema de monocultivo de pDC o mDC, el sistema de cultivo mixto de pDC/mDC y el sistema de cultivo mixto en el que las pDC están físicamente separadas de las mDC.

<Método experimental>

Se sometieron pDC y mDC inducidas a partir de células de médula ósea con la ayuda de Flt-3L a cultivo mixto de la misma manera que en el ejemplo 2, y se separaron pDC de mDC usando FACS Aria (BD). Posteriormente, se sometieron pDC y mDC a cultivo a una densidad de $1x10^5$ células/ml en las condiciones descritas a continuación: (1) en un sistema de monocultivo en el que las pDC están separadas de las mDC (indicados como pDC o mDC); (2) en un sistema de cultivo mixto en el que las pDC están físicamente en contacto con las mDC (pDC:mDC = 1:1); y (3) un sistema de cocultivo de pDC/mDC en el que el contacto físico entre pDC y mDC está bloqueado con una membrana semipermeable (indicadas como pDC/mDC o mDC/pDC, las células cultivadas sobre una membrana semipermeable y en contacto con las bacterias del ácido láctico se muestran a la izquierda). Se usó un filtro Transwell (Corning) como membrana semipermeable, y la cantidad de bacterias del ácido láctico añadida fue de 10 μg/ml. Se realizó el cultivo durante 2 días y entonces se sometió a ensayo la cantidad de IFN-α en el sobrenadante de cultivo. Como control positivo, se usó ADN CpG (ODN1585), cuya capacidad para la activación de pDC se ha conocido, a 0,1 μM. Se unieron pDC clasificadas a portaobjetos de vidrio (Matsunami glass Ind., Ltd) usando un instrumento Cytospin (Thermo Scientific), se tiñeron con Diff-Quick (Sysmex), y luego se observaron bajo un microscopio (Olympus Corporation).

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 7. Las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 presentaban respuestas similares. Específicamente, no tuvo lugar la producción de IFN-α en el sistema de monocultivo de mDC, se indujo una pequeña cantidad de IFN-α en el sistema de monocultivo de pDC, y se observó un nivel significativo de producción de IFN-α en el sistema de cultivo mixto de pDC/mDC. La figura 8 muestra fotografías que muestran las configuraciones de pDC cuando se añaden *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 al sistema de monocultivo de pDC. La figura 8A muestra los resultados de un control (sin la adición de bacterias del ácido láctico), la figura 8B muestra las pDC cuando se añadió JCM5805, la figura 8C muestra las pDC cuando se añadió JCM20101 y la figura 8D muestra las pDC cuando se añadió ATCC53103. Como resultado de una comparación de las pDCs tras la adición de las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 y las pDC sin la adición de las mismas, se observó aparentemente un proceso celular característico de una célula dendrítica activada cuando se añadieron las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101. Cuando se añadió *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103, sin embargo, no se detectó un proceso tal como el observado cuando se añadió la cepa *Lactococcus lactis* JCM5805 o JCM20101. De manera más interesante, el nivel de producción de IFN-α se redujo drásticamente hasta un nivel equivalente al logrado en el monocultivo de pDC cuando se bloqueó el contacto físico entre las pDC y las mDC con una membrana semipermeable. Por tanto, se encontró que sería necesaria la presencia de mDC con el fin de inducir completamente la producción de IFN-α por medio de la activación de pDC, aunque las pDC son dianas primarias de bacterias del ácido láctico. Además, se encontró que la interferencia mDC/pDC estaba mediada por un contacto célula a célula en

lugar de por un factor humoral. Puesto que se observa sustancialmente el mismo fenómeno con la adición de ADN CpG, se verificó que el papel de mDC en tal activación de pDC sería un mecanismo universal que no estaría limitado a una sustancia particular (es decir, bacterias del ácido láctico). Tanto las pDC como las mDC están presentes en el cuerpo humano, y tal mecanismo sería un factor clave cuando se considera la aplicación de las mismas a seres humanos.

[Ejemplo 7] Identificación de los receptores implicados

Se examinaron las señales esenciales para que las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 produzcan IFN-α usando ratones deficientes en TLR.

<Método experimental>

Se adquirieron ratones deficientes en TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 y MyD88 (de 8 a 10 semanas de edad, machos) y ratones C57BL/6 de tipo natural (de 8 a 10 semanas de edad, machos) de Charles River Laboratories. Se indujeron pDC y mDC a partir de células de médula ósea de tales ratones de la misma manera que en el ejemplo 2, y se añadieron *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103. Además de los 3 TLRL descritos en el ejemplo 3, se usó TLR7L (ARNmc40, 5 μg/ml, InvivoGen) como control positivo. Se recogió el sobrenadante de cultivo 48 horas después, y se sometió a ensayo la cantidad de IFN-α producida en el sobrenadante de cultivo por medio de ELISA.

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 9A y en la figura 9B. La figura 9A muestra los resultados referentes a ratones deficientes en TLR2 y ratones deficientes en TLR4, y la figura 9B muestra los resultados referentes a ratones deficientes en TLR7, ratones deficientes en TLR9 y ratones deficientes en MyD88. En las figuras, “WT” representa los resultados referentes a ratones de tipo natural. No se observaron cambios en la capacidad para la producción de IFN-α en las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 en ratones deficientes en TLR2 o TLR4, y por consiguiente se negó la implicación de los mismos. Cuando se añadió la cepa o bien *Lactococcus lactis* JCM5805 o bien JCM20101 a los ratones, desapareció completamente el IFN-α en ratones deficientes en TLR9 y MyD88 por la desactivación de TLR9 y MyD88, respectivamente. Por consiguiente, se verificó que el TLR9 desempeña un papel clave en la producción de IFN-α por las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101.

[Ejemplo 8]

Identificación de una sustancia activa

En el ejemplo 5, se encontró que el TLR9 era un receptor de reconocimiento para las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101. Se intentó la identificación de los ligandos de los mismos. El ADN representado por ADN CpG se conoce como ligando de TLR9. Con respecto al ARN, que es también un ácido nucleico, el ARNmc representado por el virus de ARN se conoce como TLR7L, y el ARNbc se conoce como TLR3L. Puesto que se dedujo que el ADN o ARN era un ligando, se extrajo ADN y ARN de ambas cepas con el fin de inspeccionar la actividad.

<Método experimental>

Preparación de ADN a partir de bacterias del ácido láctico

Según el procedimiento del ejemplo 1, se sometieron *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 a cultivo estacionario. Se recogieron las cepas y luego se lavaron tres veces con agua estéril. Se añadió al mismo una disolución ajustada para que comprendiese Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM y sacarosa al 6,7 % (pH 8,0). Posteriormente, se añadieron N-acetilmuramidasa (2,5 mg/ml, Seikagaku Kogyo) y lisozima (50 mg/ml, Seikagaku Kogyo), y se permitió que el resultante reposara a 37 ºC durante 45 minutos. Además, se añadieron al mismo Tris-HCl 50 mM, EDTA 250 mM (pH 8,0) y SDS al 10 %, y se permitió que el resultante reposara a 37 ºC durante 10 minutos. Se añadió NaCl 5,0 M, se añadieron al mismo fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.), y se sometió la mezcla a centrifugación. Se recuperó selectivamente el sobrenadante, se añadió al mismo etanol en una cantidad de dos veces la cantidad del sobrenadante, y entonces se sometió el resultante a centrifugación. Se retiró el sobrenadante, se añadió etanol al 70 % al precipitado y entonces se llevó a cabo centrifugación. Se retiró el sobrenadante, se añadió ARNasa (Qiagen) al mismo y se permitió que el resultante reposara a 37 ºC durante 60 minutos. Además, se añadió NaCl 5,0 M al mismo, se añadieron al mismo fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.), y se sometió la mezcla a centrifugación. Se retiró selectivamente el sobrenadante, se añadió al mismo etanol en una cantidad de dos veces la cantidad del sobrenadante y entonces se sometió el resultante a centrifugación. Se retiró el sobrenadante, se añadió etanol al 70 % al precipitado y entonces se llevó a cabo centrifugación. Se añadió agua libre de nucleasa (Qiagen) al precipitado del que se había retirado el sobrenadante. Se añadieron los ADN de

Lactococcus lactis JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 preparados de la manera descrita anteriormente al sistema de cultivo de pDC/mDC a 0,1 μg/ml, 1 μg/ml y 10 μg/ml, respectivamente. Se recogió el sobrenadante 48 horas después, y se sometió a ensayo la cantidad de IFN-α producida en el sobrenadante de cultivo por medio de ELISA. Se usaron las cepas bacterianas como controles.

Preparación de ARN total a partir de bacterias del ácido láctico

Según el procedimiento del ejemplo 1, se sometieron *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 a cultivo estacionario. Se recogieron las cepas y luego se lavaron tres veces con agua estéril. Se añadió a las mismas el reactivo RNAprotect Bacteria (Qiagen), y se permitió que el resultante reposara a 37 ºC durante 5 minutos, seguido por centrifugación. Se retiró el sobrenadante, se añadió lisozima (5 mg/ml, Seikagaku Kogyo) y se permitió que el resultante reposara a 37 ºC durante 10 minutos. Después de eso, se prepararon ARN totales a partir de *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 a través de tratamiento con ADNasa (Qiagen) con el uso del kit RNeasy Mini (Qiagen). Se añadieron los ARN totales al sistema de cultivo según el ejemplo 3 a 0,1 μg/ml, 1 μg/ml y 10 μg/ml, respectivamente. Se recogió el sobrenadante de cultivo 48 horas después, y se sometió a ensayo la cantidad de IFN-α producida en el sobrenadante de cultivo por medio de ELISA. Se usaron las cepas bacterianas como controles.

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 10. Se encontró que los ADN de las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 tienen una fuerte actividad de inducción de IFN-α, tal como se esperaba. Se detectó aparentemente actividad cuando se añadió *Lactococcus lactis* JCM5805 a 1 μg/ml y cuando se añadió *Lactococcus lactis* JCM20101 a 10 μg/ml. Aunque no se detectó actividad en *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103, se encontró que el ADN de la misma ejercía actividad a un nivel equivalente al de *Lactococcus lactis* JCM20101. Más sorprendentemente, se detectó actividad cuando se añadió ARN total de *Lactococcus lactis* JCM20101, y se indujo producción de IFN-α a 1 μg/ml o más.

Estos resultados demuestran lo siguiente: (1) el ADN es la sustancia activa de la actividad de inducción de la producción de IFN-α y el ADN de una cepa inactiva tiene actividad; y (2) puesto que bacterias del ácido láctico que activan pDC e inducen IFN-α representadas por las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 se reconocen por pDC como cepas, se detecta actividad sin realizar extracción de ADN. Una cepa tal como *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 es inactiva porque no se reconoce por pDC; y (3) el ARN de bacterias del ácido láctico se vuelve activo además del ADN y funciona como TLRL, aunque es muy poco común. Si se tienen en consideración los ejemplos mencionados anteriormente, el ARN de *Lactococcus lactis* JCM20101 es el ligando de ARN para TLR9, cuyo ligando se ha sabido que es ADN, descubierto por primera vez.

[Ejemplo 9]

Examen de los efectos de ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805 usando ratones sanos

En los ejemplos anteriores, se encontró que algunas bacterias del ácido láctico tienen la capacidad de activación de pDC y de inducción de la producción de IFN-α *in vitro.* Por tanto, se designó *Lactococcus lactis* JCM5805 como ejemplo representativo y se examinó con respecto a los efectos inmunoestimuladores *in vivo* logrados por medio de administración oral.

<Método experimental>

Se proporcionaron tres grupos de ratones C57BL/6 (7 semanas de edad, hembras) que consistía cada uno en 5 individuos: un grupo al que se le administraron piensos convencionales (AIN93G, Oriental Yeast Co., Ltd.); un grupo al que se le administraron piensos mixtos que contenían *Lactococcus lactis* JCM5805; y un grupo al que se le administraron piensos mixtos que contenían *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103. Se ajustó la dosis de bacterias del ácido láctico a 10 mg por ratón al día. Se llevó a cabo la toma de muestras de sangre el día 0, día 3 y día 7 (en el momento del examen anatómico), y se sometió a ensayo la cantidad de IFN-α producida en la sangre por medio de ELISA. En el momento del examen anatómico, se extrajeron el bazo y el ganglio linfático mesentérico, y se prepararon fracciones celulares de baja densidad que contenían células dendríticas enriquecidas de la manera descrita a continuación. (Según una técnica convencional, se preparan linfocitos esplénicos y linfocitos de ganglio linfático mesentérico, se suspenden estas células en HBSS (Gibco) que contiene HEPES 20 mM (Gibco), y se superpone la suspensión celular resultante en medio RPMI que contiene FCS al 10 % (Sigma) que comprende Histodenz (Sigma-Aldrich) disuelto hasta una concentración final del 15 %. Tras la centrifugación, se recuperan las células en la capa intermedia (es decir, fracciones celulares de baja densidad)). Se tiñeron las fracciones celulares de baja densidad con anticuerpo anti-CD11b-APC-Cy7 (BD Pharmingen), anticuerpo anti-mPDCA-1-APC (Milteny Biotec) y anticuerpo anti-CD11c-PE-Cy7 (eBiosciencs) para la clasificación de pDC y con anticuerpo anti-CMH de clase II-FITC (eBiosciencs) y anticuerpo anti-CD86-PE (eBiosciencs) como indicadores para la activación. Se determinó la clasificación de pDC ($CD11c^{int}CD11b^{-}mPDCA\text{-}1^{+}$) *in vivo* por medio de citometría de flujo, y se

sometieron a ensayo los niveles de expresión de CMH de clase II y CD86 como marcadores de activación de pDC. La figura 11 muestra un resumen de un método para examinar los efectos de la ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805 usando ratones sanos.

<Resultados>

La figura 12 muestra los resultados de los ensayos de IFN-α en sangre, y la figura 13A a la figura 13D muestran los resultados de activación de pDC. La figura 13A y la figura 13B muestran los cambios en los niveles de CMH de clase II en pDC del bazo y el ganglio linfático mesentérico, respectivamente, y la figura 13C y la figura 13D muestran los cambios en los niveles de CD86 en pDC del bazo y el ganglio linfático mesentérico, respectivamente. El nivel de IFN-α en sangre no aumentó en absoluto en el grupo al que se le había administrado *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 como en el caso del grupo al que se le habían administrado los piensos convencionales. En cambio, se observaron tendencias ascendentes en los niveles de IFN-α el día 3 y día 7 en el grupo al que se le había administrado *Lactococcus lactis* JCM5805 (figura 12). Con respecto a la activación de pDC, no se observaron cambios en los niveles de CMH de clase II o CD86 en los linfocitos o bien esplénicos o bien del ganglio linfático mesentérico del grupo al que se le había administrado *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103. Aunque no tuvo lugar activación de pDC en el bazo del grupo al que se le había administrado *Lactococcus lactis* JCM5805, se observó un nivel significativo de activación en tanto CMH de clase II como CD86 en el ganglio linfático mesentérico.

Los resultados anteriores indican que *Lactococcus lactis* JCM5805 estimularía pDC *in vivo*, así como *in vitro*, y sería capaz de inducir la producción de IFN-α.

[Ejemplo 10]

Examen de los efectos de la ingestión de JCM5805 usando modelos de inmunosupresión

Las bacterias del ácido láctico según la presente invención se administrarían a personas con el sistema inmunitario debilitado o ancianos, así como personas sanas. Por tanto, se examinaron los efectos de la ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805 usando modelos de inmunosupresión.

<Método experimental>

Se proporcionaron dos grupos de ratones C57BL/6 (7 semanas de edad, hembras) que consistían cada uno en 5 individuos: un grupo al que se le administraron piensos convencionales (AIN93G, Oriental Yeast Co., Ltd.); y un grupo al que se le administraron piensos mixtos que contenían *Lactococcus lactis* JCM5805. La duración de la administración de *Lactococcus lactis* JCM5805 fue de dos semanas, el día en el que se inició la administración de *Lactococcus lactis* JCM5805 se designó como “día -7,” y se administró un agente inmunosupresor (ciclofosfamida, Sigma-Aldrich) por vía intraperitoneal 200 mg/kg el día 0. Se llevó a cabo la toma de muestras de sangre el día -7, día -1, día 3 y día 7 (en el momento del examen anatómico), y se sometieron a ensayo los niveles de IFN-α en sangre de la misma manera que en los ejemplos anteriores. Se sometieron los ratones a examen anatómico al final y se sometió a ensayo el grado de activación de pDC en el bazo de la misma manera que en los ejemplos anteriores. Se midieron los pesos corporales simultáneamente con la toma de muestras de sangre. La figura 14 muestra un resumen de un método para la evaluación de JCM5805 usando modelos de inmunosupresión.

<Resultados>

La figura 15A muestra los cambios en los pesos corporales de modelos de ratón de inmunosupresión y la figura 15B muestra los cambios en los niveles de IFN-α en sangre. La figura 16A muestra los cambios en los niveles de CMH de clase II en pDC y la figura 16B muestra los cambios en los niveles de CD86 en pDC. La figura 16C muestra el porcentaje de pDC y la figura 16D muestra los resultados del análisis citométrico de flujo. Se observó una disminución significativa en los pesos corporales de ratones del grupo al que se le habían administrado piensos convencionales tras la administración de ciclofosfamida. En cambio, la pérdida de peso corporal tendía a suprimirse en el grupo al que se le había administrado *Lactococcus lactis* JCM5805. En el grupo al que se le habían administrado piensos convencionales, IFN-α se volvía indetectable en la sangre al final; sin embargo, todavía se observaba producción de IFN-α en el momento de la autopsia en el grupo al que se le había administrado *Lactococcus lactis* JCM5805. Como resultado de una comparación del grado de activación de pDC en el bazo, los niveles de CMH de clase II y CD86 aumentaron significativamente en el grupo al que se le había administrado *Lactococcus lactis* JCM5805, en comparación con aquellos en el grupo al que se le había administrado piensos convencionales. De manera más interesante, el porcentaje de pDC en el bazo estaba significativamente aumentado en el grupo al que se le había administrado *Lactococcus lactis* JCM5805. Los resultados anteriores indican que *Lactococcus lactis* JCM5805 ingerido por vía oral es capaz de antagonizar la inmunosupresión inducida por estrés, envejecimiento u otros factores de la vida diaria, y la contribución de tal cepa a la prevención de infecciones provocadas por un sistema inmunitario debilitado es significativa.

[Ejemplo 11]

Verificación de la producción apropiada de productos lácteos

Con el uso de las bacterias del ácido láctico según la presente invención, se prepararon leche fermentada (yogur sólido, yogur batido) y queso natural.

El “yogur sólido” se denomina también “yogur firme” o “yogur sin batir”, que se somete a fermentación en un recipiente.

El “yogur batido” se denomina también “yogur fermentado” o “yogur líquido”, que se somete a fermentación y luego se carga en un recipiente.

<Método experimental>

1. Yogur sólido (cultivo mixto con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*)

(1) Como materias primas, se usaron leche cruda (por ejemplo, leche o leche en polvo desnatada), dextrina cíclica altamente ramificada (“Cluster Dextrin” (nombre comercial), Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.), péptido lácteo (un producto de uso general) y un aroma de yogur (T. Hasegawa Co., Ltd.).

Tabla de formulación 1

	Razón de composición
Leche	60 %
Leche en polvo desnatada	4,2 %
Péptido lácteo	0,10 %
Cluster Dextrin	1,0 %
Aroma de yogur	0,03 %
Iniciador de ácido láctico (*L. bulgaricus*, *St. thermophilus*)	3,0 %
Iniciador de ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805)	3,0 %

(2) Se mezclaron las materias primas para preparar una dispersión, se calentó la dispersión resultante hasta aproximadamente 70 ºC y se aplicó el resultante a un homogeneizador a una presión de homogeneización (de 15 a 17 MPa). Se esterilizó térmicamente el resultante a 95 ºC durante aproximadamente 10 minutos, se enfrió el resultante hasta aproximadamente 35 ºC, se añadieron al mismo bacterias del ácido láctico (especies bacterianas: *L. bulgaricus*, *St. thermophilus* y *Lc. lactis* JCM5805) y se cargó el resultante en un recipiente con una tapa, seguido por fermentación a 32 ºC durante de aproximadamente 6 a 7 horas. Cuando la acidez del ácido láctico alcanzó 0,70, se enfrió el resultante hasta 10 ºC y se almacenó.

Resultados:

(1) Aroma: bueno

(2) Recuento de bacterias del ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805): 10^7 células/g o más.

2. Yogur sólido

(1) Como materias primas, se usaron leche cruda (por ejemplo, leche o leche en polvo desnatada), dextrina cíclica altamente ramificada (“Cluster Dextrin” (nombre comercial), Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.), péptido lácteo (un producto de uso general) y un aroma de yogur (T. Hasegawa Co., Ltd.).

Tabla de formulación 2

	Razón de composición
Leche	60 %
Leche en polvo desnatada	4,2 %
Péptido lácteo	0,10 %
Cluster Dextrin	1,0 %
Aroma de yogur	0,03 %
Iniciador de ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805)	6,0 %

(2) Se mezclaron las materias primas para preparar una dispersión, se calentó la dispersión resultante hasta aproximadamente 70 ºC y se aplicó el resultante a un homogeneizador a una presión de homogeneización (de 15 a 17 MPa). Se esterilizó térmicamente el resultante a 95 ºC durante aproximadamente 10 minutos, se enfrió el resultante hasta aproximadamente 35 ºC, se añadieron a lo mismo bacterias del ácido láctico (especie bacteriana:

Lc. lactis JCM5805) y se cargó el resultante en un recipiente con una tapa, seguido por fermentación a 32 ºC durante aproximadamente 16 horas. Cuando la acidez del ácido láctico alcanzó 0,70, se enfrió el resultante hasta 10 ºC y se almacenó.

Resultados:

(1) Aroma: bueno

(2) Recuento de bacterias del ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805): 10^7 células/g o más.

3. Yogur batido

(1) Como materias primas, se usaron leche cruda (por ejemplo, leche o leche en polvo desnatada), dextrina cíclica altamente ramificada ("Cluster Dextrin" (nombre comercial), Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.), péptido lácteo (un producto de uso general) y un aroma de yogur (T. Hasegawa Co., Ltd.).

Tabla de formulación 3

	Razón de composición
Leche	60 %
Leche en polvo desnatada	4,2 %
Péptido lácteo	0,10 %
Cluster Dextrin	1,0 %
Aroma de yogur	0,03 %
Iniciador de ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805)	4,0 %

Se mezclaron las materias primas para preparar una dispersión, se calentó la dispersión resultante hasta aproximadamente 70 ºC y se aplicó el resultante a un homogeneizador a una presión de homogeneización (de 15 a 17 MPa). Se esterilizó térmicamente el resultante a 125 ºC, se enfrió el resultante hasta aproximadamente 35 ºC y se añadieron a lo mismo bacterias del ácido láctico (especie bacteriana: *Lc. lactis* JCM5805), seguido por fermentación a 32 ºC durante aproximadamente 16 horas. Se terminó la fermentación a pH 4,6, se enfrió el producto hasta aproximadamente 20 ºC y se cargó el resultante en un recipiente con agitación, seguido por refrigeración a 10 ºC o menos.

Resultados:

(1) Aroma: bueno

(2) Recuento de bacterias del ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805): 10^7 células/g o más.

4. Yogur bebible

(1) Como materias primas, se usaron leche cruda (por ejemplo, leche o leche en polvo desnatada), dextrina cíclica altamente ramificada ("Cluster Dextrin" (nombre comercial), Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.), péptido lácteo (un producto de uso general) y un aroma de yogur (T. Hasegawa Co., Ltd.).

Tabla de formulación 4

	Razón de composición
Leche	30 %
Leche en polvo desnatada	6 %
Péptido lácteo	0,20 %
Cluster Dextrin	1,0 %
Azúcar	8 %
Aroma de yogur	0,03 %
Iniciador de ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805)	6,0 %

(2) Se mezclaron las materias primas para preparar una dispersión, se calentó la dispersión resultante hasta aproximadamente 70 ºC y se aplicó el resultante a un homogeneizador a una presión de homogeneización (de 15 a 17 MPa). Se esterilizó térmicamente el resultante a 125 ºC, se enfrió el resultante hasta aproximadamente 35 ºC y se añadieron a lo mismo bacterias del ácido láctico (especie bacteriana: *Lc. lactis* JCM5805), seguido por fermentación a 32 ºC durante aproximadamente 16 horas. Se terminó la fermentación a pH 4,6, se enfrió el producto hasta aproximadamente 10 ºC y se homogeneizó el resultante (a vacío), seguido por refrigeración a 10 ºC o menos.

Resultados:

(1) Aroma: bueno

(2) Recuento de bacterias del ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805): 10^7 células/g o más.

5. Queso natural

(1) Como materias primas, se usaron leche cruda (es decir, leche), cuajo (Standard Plus290, Christian Hansen) y cloruro de calcio (un producto de uso general).

Tabla de formulación 5

Materias primas	Cepa individual
Leche	100 %
Iniciador de ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5808)	3 %
Cuajo	0,003 %
Cloruro de calcio al 20 %	0,0025 %
Suero lácteo retirado	-50 %

(2) Se esterilizó térmicamente leche cruda a 75 ºC durante 15 segundos, se enfrió el resultante hasta aproximadamente 30 ºC y se añadieron al mismo bacterias del ácido láctico (especie bacteriana: *Lc. lactis* JCM5805), seguido por fermentación a 30 ºC durante aproximadamente 1 hora. Se terminó la fermentación a pH 6,4 y acidez de aproximadamente 0,13, se añadieron cloruro de calcio y cuajo (Standard Plus290, Christian Hansen), se agitó la mezcla durante aproximadamente 3 minutos y se confirmó la formación de cuajadas 30 minutos después. Se cortaron las cuajadas en cuadrados con tamaños de aproximadamente 1 a 2 cm. Se retiró el suero lácteo, se empaquetaron las cuajadas en un molde y se invirtió el molde varias veces y se permitió que reposara durante 12 horas.

Se ajustó el contenido en humedad del producto con presurización aplicando un peso que es aproximadamente 10 veces mayor que el de las cuajadas empaquetadas en el molde.

Resultados:

(1) Aroma: bueno

(2) Recuento de bacterias del ácido láctico (*Lc. lactis* JCM5805): 10^7 células/g o más.

[Ejemplo 12]

Efectos de *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* 20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 vivas

Según los ejemplos anteriores, se conoce la actividad de bacterias muertas por calor; sin embargo, sigue sin conocerse si las bacterias vivas actuarían o no sobre las pDC. Por tanto, se inspeccionaron los efectos de *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* 20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 vivas sobre pDC de ratón usando el sistema de cultivo de pDC/mDC.

<Método experimental>

Preparación de bacterias del ácido láctico vivas

Según el procedimiento del ejemplo 1, se sometieron *Lactococcus lactis* JCM5805, *Lactococcus lactis* JCM20101 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 a cultivo estacionario. Se recogieron las cepas, se lavaron tres veces con agua estéril y luego se suspendieron en PBS. Se determinó el recuento de bacterias del ácido láctico usando un dispositivo de medición de la distribución del tamaño de partícula (CDA-1000X, Sysmex Corporation), se añadieron las células al sistema de cultivo de pDC/mDC a concentraciones de $1x10^6$, $1x10^7$ y $1x10^8$ células, y se realizó el cultivo en un incubador de CO_2 durante 48 horas. Se recuperó el sobrenadante de cultivo, y se sometió a ensayo la cantidad de IFN-α producida en el sobrenadante de cultivo.

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 18. Mientras que *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 vivas indujeron producción de IFN-α de una manera dependiente del recuento bacteriano, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 viva no indujo producción de IFN-α en absoluto. Independientemente de si las cepas *Lactococcus lactis* JCM5805 y JCM20101 están o no muertas por calor o vivas, se encontró que estas cepas activan pDC e inducen de manera potente la producción de IFN-α.

[Ejemplo 13]

Actividad de *Lactococcus lactis* JCM5805 sobre pDC humanas

En los ejemplos anteriores, se encontraron bacterias del ácido láctico capaces de actuar sobre pDC de ratón; sin embargo, se desconocía si tales bacterias eran capaces o no de actuar sobre pDC humanas. Por tanto, se aislaron pDC de PBMC humanas con MACS, se designó JCM5805 como muestra representativa y se inspeccionó la actividad de la misma sobre pDC humanas.

<Método experimental>

Se adquirieron PBMC de LONZA.

Aislamiento de pDC con MACS e inspección de la pureza

Según los protocolos del kit de aislamiento de células dendríticas plasmacitoides (Miltenyi Biotec), se aislaron pDC humanas con MACS (pureza: 97 %). Se cultivaron pDC humanas ($5x10^4$ células) sobre una placa de fondo plano de 96 pocillos (Corning). A las pDC humanas aisladas, se les añadió IL-3 (R&D Systems) a 10 ng/ml como factor de supervivencia. Con el fin de inspeccionar la pureza de pDC humanas, se tiñeron las pDC humanas con anticuerpo anti-CD123-FITC (AC145) y anticuerpo anti-BDCA4-APC (AD-17F6) (Miltenyi Biotec) para la clasificación de pDC humanas y luego se analizaron usando el instrumento FACS Canto II (BD).

Adición de ligando, cultivo celular y ELISA

Se añadió *Lactococcus lactis* JCM5805 hasta una concentración final de 10 μg/ml, y se realizó el cultivo en un incubador de CO_2 durante 24 horas. Se sometieron a ensayo los niveles de IFN-α humano usando el kit de ELISA de IFN-α humano (PBL Biomedical Laboratories).

Análisis de la expresión génica de IFN por medio de RT-PCR

Se recuperaron las células cultivadas, y se extrajeron los ARN totales usando el kit RNeasy Mini (Qiagen). Se sintetizó ADNc a partir de 200 ng de ARN total usando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad), y se amplificaron los genes de IFN-α1, IFN-β, IFN-λ1 y GAPDH por medio de PCR usando el ADNc sintetizado como molde. Se llevó a cabo la PCR usando TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) y los cebadores descritos en el documento no de patente 7. Según protocolos generales, se sometieron los genes de IFN-α1, IFN-β, IFN-λ1 y GAPDH a la reacción a 94 ºC durante 1 minuto, y un ciclo de 94 ºC durante 30 segundos, a 49 ºC, 45 ºC, 49 ºC y 45 ºC durante 30 segundos, respectivamente, y 72 ºC durante 15 segundos repetidos 35 veces, seguido por la reacción a 72 ºC durante 3 minutos. Se sometió a electroforesis la disolución de reacción PCR según una técnica general, y se inspeccionaron el desarrollo de fragmentos amplificados y la densidad de los mismos.

<Resultados>

Los resultados se muestran en la figura 19. La figura 19A, figura 19B y figura 19C muestran la pureza de pDC humanas aisladas con MACS, la cantidad de producción de IFN-α detectada al nivel de proteína mediante ELISA y los niveles de expresión génica de IFN-α1, IFN-β, IFN-λ y GAPDH detectados mediante RT-PCR. Con la adición de *Lactococcus lactis* JCM5805, se observó inducción de la producción de IFN-α al nivel de proteína. Además, se detectó inducción de la expresión génica de IFN-α1, IFN-β e IFN-λ. Los resultados anteriores demuestran que *Lactococcus lactis* JCM5805 activaría también pDC humanas.

[Ejemplo 14] Influencia de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805 sobre la actividad antiviral humana

En los ejemplos anteriores, se verificaron los efectos de *Lactococcus lactis* JCM5805 sobre células de ratón y humanas *in vitro* y los efectos de la misma logrados tras la ingestión por ratones. Basándose en tales resultados, se examinaron los efectos logrados tras la ingestión por humanos.

<Exposición de las pruebas>

Alimentos de prueba

Se usaron dos tipos de productos de prueba descritos a continuación.

(1) Producto de prueba: bebida de yogur que contiene *Lactococcus lactis* JCM5805

(2) Producto de placebo: bebida similar a yogur que no contiene bacterias del ácido láctico

Propósito:

Esta prueba se llevó a cabo con el objetivo de examinar la influencia de las bacterias del ácido láctico sobre biomarcadores sanguíneos asociados con actividad antiviral y sobre la evaluación subjetiva mediante cuestionarios referentes a las condiciones físicas de adultos masculinos y femeninos sanos y trabajadores que habían ingerido de manera continua bebidas de yogur que contenían *Lactococcus lactis* JCM5805 durante aproximadamente 4 semanas, en comparación con el experimento de control realizado con el uso de bebidas similares a yogur que no contenían bacterias del ácido láctico como placebos.

Sujetos de prueba:

Fueron sujetos de prueba aquellos que no tenían una enfermedad crónica grave, alergia a la leche u otras afecciones, aquellos que se evaluó que no tenían problemas mediante una prueba de virus particular, aquellos que eran capaces de restringir la ingesta de yogur y queso durante el periodo de ingestión de producto de prueba y aquellos que no tomaban medicamentos esteroides (uso interno o externo).

Número de sujetos:

Se emplearon treinta y ocho sujetos (dos grupos que consistían cada uno en 19 sujetos).

Diseño de la prueba:

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, de grupos paralelos.

Cantidad de componente de prueba que va a ingerirse al día:

La dosis diaria era de aproximadamente 1 x 10^{11} ufc de *Lactococcus lactis* JCM5805.

Método de ingestión

Se pidió a los sujetos de prueba que bebieran una botella del producto de prueba (100 ml) antes o después de la comida por la mañana cada día.

Programa de la prueba

El periodo de ingestión del producto de prueba fue de aproximadamente 4 semanas. Se llevó a cabo la toma de muestras de sangre tres veces: antes de la prueba para el agrupamiento (1 mes antes del inicio de la ingestión); en la semana 0 (el día antes del inicio de la ingestión); y en la semana 4 (el día después de la finalización de la ingestión). Los sujetos de prueba contestaron los cuestionarios referentes a las condiciones físicas cada día durante el periodo de ingestión.

Puntos de evaluación

Se sometieron a ensayo la actividad de pDC en la sangre (marcadores de superficie de pDC: CMH de clase II y CD86), la expresión génica de IFN-α en la sangre y la capacidad de producción de IFN-α tras la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con ADN CpG, y se llevó a cabo la evaluación subjetiva de los síntomas de resfriado según los cuestionarios referentes a las condiciones físicas.

<Método experimental>

Se analizaron biomarcadores sanguíneos aislando PBMC de las muestras de sangre obtenidas en la semana 0 y la semana 4 y examinando las PBMC aisladas.

Se tiñeron las PBMC (1x10^6 células) con anticuerpos anti-CD123-FITC (AC145) (Miltenyi Biotec), anti-BDCA4-APC (AD-17F6) (Miltenyi Biotec), anti-CD86-PE (B7.2) (eBioscience) y anti-HLA-DR-PerCP (L243) (BD Biosciences) según una técnica convencional. Se sometieron a ensayo las intensidades de fluorescencia de HLA-DR (CMH de clase II) y CD86 de las poblaciones celulares detectadas en $CD123^+$/$BDCA4^+$ con el uso del instrumento FACS Canto II (BD), y se emplearon los valores determinados como indicadores de la activación de pDC.

Se detectó expresión génica de IFN-α en la sangre extrayendo los ARN totales de 1x10^6 PBMC usando el kit RNeasy Mini (Qiagen). Se sintetizó ADNc a partir de 100 ng de ARN total usando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad), y se analizó el gen de IFN-α1 (el gen de GAPDH como referencia) por medio de PCR en tiempo real usando el ADNc sintetizado como molde. Se llevó a cabo el análisis de PCR en tiempo real usando SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) y los cebadores descritos en el documento no de patente 7. Según protocolos generales, se sometieron las muestras a la reacción a 95 ºC durante 10 segundos, seguido por un ciclo de 95 ºC durante 10

segundos, 49 ºC durante 5 segundos y 72 ºC durante 10 segundos repetidos 50 veces.

Con el fin de inspeccionar la capacidad de producción de IFN-α tras la estimulación de las pDC sanguíneas con ADN CpG, se sembraron $5x10^5$ PBMC en una placa de fondo plano de 24 pocillos (Corning), y se añadió a la misma CpG-ODN2216 (CpG-A) (InvivoGen) hasta la concentración final de 0,5 μM/ml. Con respecto a todas las muestras obtenidas de los sujetos, se prepararon muestras de control que no contenían ADN CpG. Se realizó el cultivo en un incubador de CO_2 a 37 ºC durante 24 horas, se recuperó el sobrenadante y se sometió a ensayo la cantidad de producción de IFN-α usando los pares de anticuerpos coincidentes frente a IFN-α humano para ELISA (eBioscience).

Cuando se permitió que *Streptococcus pyogenes* o virus de la gripe actuara sobre pDC humanas *in vitro*, se elevó el nivel de expresión de CMH de clase II con una buena respuesta, aunque no se observó un aumento significativo en el nivel de expresión de CD86 (documento no de patente 8). Por consiguiente, se designó a CMH de clase II como marcador de activación principal, y se sometieron 36 muestras que presentaban valores de actividad de CMH de clase II promedio ± 2 DE (18 muestras de cada grupo) a análisis de todos los biomarcadores. Se dividieron las muestras en las que presentaban valores superiores a la actividad de CMH de clase II promedio sometida a ensayo en la semana 0 (denominada a continuación en el presente documento “actividad de pDC superior”) y las que presentaban valores inferiores a tal promedio (denominada a continuación en el presente documento “actividad de pDC inferior”), y se analizaron estas muestras por separado.

En los cuestionarios referentes a las condiciones físicas, se clasificaron 7 síntomas de resfriado principales (es decir, goteo nasal, congestión nasal, estornudos, dolor de garganta, picor de garganta, tos, cefalea y fiebre) usando una escala de 5 puntos (desde 1: sin síntoma, hasta 5: síntoma grave) cada día. El promedio de los 7 puntos se designó como indicador de la gravedad de los síntomas del resfriado.

<Resultados>

Los resultados de los ensayos para la actividad de pDC en la sangre se muestran en la figura 20. La figura 20A y figura 20D muestran los cambios en la actividad de CMH de clase II y CD86 en pDC observados en los ensayos de actividad desde la semana 0 hasta la semana 4. Los cambios en la actividad de CMH de clase II y CD86 del grupo que había ingerido bebidas de yogur que contenían *Lactococcus lactis* JCM5805 (a continuación en el presente documento, denominado “el grupo de JCM5805”) fueron significativamente superiores a los del grupo que había ingerido bebida similar al yogur que no contenía bacterias del ácido láctico (a continuación en el presente documento, denominado “el grupo de placebo”). Los resultados de análisis realizados por separado para las muestras que presentan actividad de pDC superior y para las muestras que presentan actividad de pDC inferior y los cambios en la actividad de CMH de clase II se muestran en la figura 20B y la figura 20C, respectivamente. Los resultados mencionados anteriormente y los cambios en la actividad de CD86 se muestran en la figura 20E y la figura 20F, respectivamente. Con respecto a los cambios en la actividad de CMH de clase II, no hubo ninguna diferencia significativa en muestras que presentaban actividad de pDC superior entre el grupo de JCM5805 y el grupo de placebo. Sin embargo, en el caso de muestras que presentaban actividad de pDC inferior, tales cambios del grupo de JCM5805 fueron significativamente superiores a los del grupo de placebo. Con respecto a los cambios en la actividad de CD86, no se observó ninguna diferencia significativa entre el grupo de JCM5805 y el grupo de placebo, independientemente de los niveles de actividad de pDC. Se considera que esto se produce porque es menos probable que CD86 se vea influido por la actividad de pDC, tal como se describe en el documento no de patente 8. Los resultados anteriores demuestran que la actividad de pDC se eleva tras la ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805 y que los efectos son más significativos para sujetos que presentan una actividad de pDC inferior y que tienen un sistema inmunitario más débil.

La figura 21 muestra los resultados del análisis de la expresión génica de IFN-α en la sangre a una actividad de pDC inferior. A una actividad de pDC inferior, no se observaron cambios significativos desde la semana 0 hasta la semana 4 en el grupo de placebo; sin embargo, se observó un aumento significativo en los niveles de expresión desde la semana 0 hasta la semana 4 en el grupo de JCM5805. A una actividad de pDC superior, no se observaron cambios significativos desde la semana 0 hasta la semana 4 en el grupo de placebo y en el grupo de JCM5805 (datos no mostrados). Los resultados demuestran que la cantidad de transcripción génica de IFN-α en la sangre humana aumenta por la ingestión de *Lactococcus lactis* JCM5805.

La figura 22 muestra los resultados de ensayos para determinar la capacidad de producción de IFN-α lograda cuando las pDC sanguíneas que presentan actividad de pDC inferior se estimulan con ADN CpG. A una actividad de pDC inferior, no se observaron cambios significativos desde la semana 0 hasta la semana 4 en el grupo de placebo; sin embargo, se observó un aumento significativo desde la semana 0 hasta la semana 4 en el grupo de JCM5805. A una actividad de pDC superior, no se observaron cambios significativos desde la semana 0 hasta la semana 4 en el grupo de JCM5805 (datos no mostrados). El ADN CpG es un ligando de ácido nucleico que selecciona como diana TLR9, y el mecanismo de reconocimiento de virus de pDC detecta ADN o ARN viral por medio de TLR9 o TLR7/8. Por consiguiente, el mecanismo de reconocimiento de virus se estimuló de manera errónea mediante la adición de un ligando de ácido nucleico (es decir, ADN CpG). Específicamente, los resultados de los experimentos indican que

la activación de pDC inducida por la estimulación con ADN CpG se potencia en el grupo de JCM5805 y conduce a una respuesta potenciada en el momento de la infección con virus.

La figura 23 muestra los resultados de los cuestionarios referentes a las condiciones físicas. Para el grupo de JCM5805 y el grupo de placebo, se determinaron cada semana el número total de días durante los que se habían desarrollado síntomas de resfriado y el número total de días durante los que no se desarrollaron síntomas de resfriado, y los resultados clínicos se sometieron a la prueba del cuadrado. Como resultado, se encontró que el número total de días durante los que los sujetos en el grupo de JCM5805 habían desarrollado síntomas de resfriado era significativamente menor, y se encontró que el número total de días durante los que los sujetos no desarrollaron síntomas de resfriado era mayor en la semana 4, en comparación con el grupo de placebo. Esto indica que la ingestión continua de *Lactococcus lactis* JCM5805 durante 4 semanas conduce a que los sujetos sean menos susceptibles a resfriados.

Los resultados anteriores demuestran que las pDC sanguíneas se activan cuando un ser humano ingiere *Lactococcus lactis* JCM5805, la capacidad de producción de IFN-α se potencia y las respuestas tras la infección con virus mejoran, lo que conduciría en consecuencia a que una persona sea menos susceptible a los resfriados. Tales efectos fueron particularmente significativos para sujetos con inmunidad inferior frente a la infección con virus (actividad de pDC) y con un alto riesgo de coger un resfriado.

Aplicabilidad industrial

Pueden usarse bacterias del ácido láctico capaces de activar pDC e inducir la producción de IFN para un producto farmacéutico o producto alimenticio o de bebida inmunoestimulador como agente para inducir la producción de IFN.

REIVINDICACIONES

1. Agente para su uso en un método de prevención o tratamiento de infección con virus que comprende como principio activo bacterias del ácido láctico de forma esférica, en el que las bacterias del ácido láctico son *Lactococcus lactis JCM5805* o *Lactococcus lactis JCM20101*.

2. El agente según la reivindicación 1, para el uso según la reivindicación 1, que es una preparación oral.

3. Producto alimenticio o de bebida que comprende el agente según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

4. El producto alimenticio o de bebida según la reivindicación 3, para su uso según la reivindicación 3, que es un producto lácteo que contiene queso o yogur.

5. El producto alimenticio o de bebida según las reivindicaciones 3 o 4, para su uso según las reivindicaciones 3 o 4, que comprende las bacterias del ácido láctico a 10^7 células/g o más.

Fig. 1A

ID de cepa	Géneros	Colección de cultivo
JCM 1192	*Bifidobacterium breve*	JCM
JCM 1217	*Bifidobacterium longum*	JCM
JCM 1021	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
JCM 1023	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
JCM 1028	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
JCM 1032	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
JCM 1034	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
JCM 1038	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
JCM 1132	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
JCM 1229	*Lactobacillus acidophilus*	JCM
IFO 3960	*Lactobacillus brevis*	IFO
IFO 12005	*Lactobacillus brevis*	IFO
IFO 12520	*Lactobacillus brevis*	IFO
IFO 13109	*Lactobacillus brevis*	IFO
IFO 13110	*Lactobacillus brevis*	IFO
JCM 1059	*Lactobacillus brevis*	JCM
IFO 12004	*Lactobacillus casei*	IFO
JCM 1134	*Lactobacillus casei*	JCM
JCM 8129	*Lactobacillus casei*	JCM
NRIC 1916	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1917	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1936	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1937	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1941	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1942	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1944	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1945	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1946	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1963	*Lactobacillus casei*	NRIC
NRIC 1981	*Lactobacillus casei*	NRIC
JCM 1002	*Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*	JCM
JCM 1012	*Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*	JCM
NRIC 1962	*Lactobacillus fermentum*	NRIC
JCM 1017	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM 1130	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM1131	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM 2124	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM 5813	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM 5814	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM 8789	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM 8790	*Lactobacillus gasseri*	JCM
JCM 1120	*Lactobacillus helveticus*	JCM
JCM 1155	*Lactobacillus ilgardii*	JCM
JCM 1022	*Lactobacillus johnsonii*	JCM
JCM 2012	*Lactobacillus johnsonii*	JCM
JCM 2122	*Lactobacillus johnsonii*	JCM
JCM 5812	*Lactobacillus johnsonii*	JCM
JCM 8791	*Lactobacillus johnsonii*	JCM
JCM 8792	*Lactobacillus johnsonii*	JCM
JCM 8793	*Lactobacillus johnsonii*	JCM
JCM 5818	*Lactobacillus kefiri*	JCM
NRIC 1968	*Lactobacillus kimuchii*	NRIC
NRIC 1969	*Lactobacillus kimuchii*	NRIC
NRIC 1970	*Lactobacillus kimuchii*	NRIC

Fig. 1B

ID de cepa	Géneros	Colección de cultivo
ATCC 25302	*Lactobacillus paracasei*	ATCC
ATCC 25303	*Lactobacillus paracasei*	ATCC
IFO 3533	*Lactobacillus paracasei*	IFO
JCM 1053	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1109	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1111	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1133	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1161	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1163	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1172	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1181	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1556	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 2123	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 2769	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 8131	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 8132	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 8133	*Lactobacillus paracasei*	JCM
JCM 1558	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8333	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8334	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8335	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8336	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8337	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8338	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8339	*Lactobacillus pentosus*	JCM
JCM 8340	*Lactobacillus pentosus*	JCM
ATCC 8014	*Lactobacillus plantarum*	ATCC
ATCC 14917	*Lactobacillus plantarum*	ATCC
JCM 1149	*Lactobacillus plantarum*	JCM
NRIC 1596	*Lactobacillus plantarum*	NRIC
JCM 1112	*Lactobacillus reuteri*	JCM
ATCC 53103	*Lactobacillus rhamnosus*	ATCC
IFO 3425	*Lactobacillus rhamnosus*	IFO
JCM 1136	*Lactobacillus rhamnosus*	JCM
JCM 1157	*Lactobacillus sakei*	JCM
JCM 1150	*Lactobacillus salivarius subsp.salicins*	JCM

Fig. 1C

ID de cepa	Géneros	Colección de cultivo
JCM 8723	*Enterococcus casseliflavus*	JCM
JCM 8730	*Enterococcus malodoratus*	JCM
NBRC 100934	*Lactococcus garvieae*	NBRC
JCM 16167	*Lactococcus lactis subsp.cremoris*	JCM
JCM 20076	*Lactococcus lactis subsp.cremoris*	JCM
NBRC 100676	*Lactococcus lactis subsp.cremoris*	NBRC
JCM 1180	*Lactococcus lactis subsp.hordniae*	JCM
JCM 11040	*Lactococcus lactis subsp.hordniae*	JCM
JCM 1158	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	JCM
JCM 5805	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	JCM
JCM 12650	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	JCM
JCM 20101	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	JCM
JCM 20128	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	JCM
JCM 20312	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	JCM
JCM 20399	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	JCM
NBRC 12007	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	NBRC
NRIC 1147	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	NRIC
NRIC 1148	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	NRIC
NRIC 1150	*Lactococcus lactis subsp.lactis*	NRIC
NBRC 12455	*Leuconostoc lactis*	NBRC
NRIC 328	*Leuconostoc lactis*	NRIC
NRIC 1540	*Leuconostoc lactis*	NRIC
NRIC 1575	*Leuconostoc lactis*	NRIC
JCM 6124	*Leuconostoc mesenteroides*	JCM
NBRC 100496	*Leuconostoc mesenteroides*	NBRC
JCM 5886	*Pediococcus damnosus*	JCM
JCM 2026	*Pediococcus pentosaceus*	JCM
JCM 5885	*Pediococcus pentosaceus*	JCM
JCM 5890	*Pediococcus pentosaceus*	JCM
JCM 20314	*Pediococcus pentosaceus*	JCM
JCM 20459	*Pediococcus pentosaceus*	JCM
JCM 20026	*Streptococcus thermophilus*	JCM
ST-21	*Streptococcus thermophilus*	DANISCO
TA40	*Streptococcus thermophilus*	DANISCO
TA45	*Streptococcus thermophilus*	DANISCO

Fig. 2A

	Bacterias con forma de bacilo	Bacterias de forma esférica
50 pg/ml < IFN-α	0 / 90 (0,00%)	13 / 35 (34,29%)

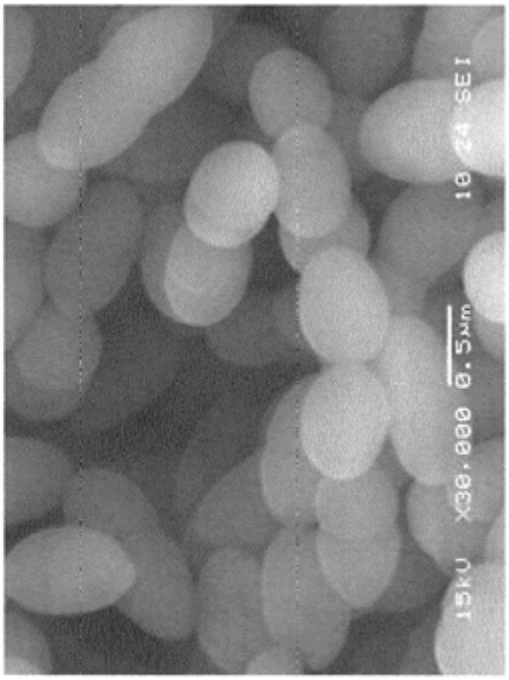
Fig. 2B

	Bacterias con forma de bacilo	Bacterias de forma esférica
100 pg/ml < IFN-α	0 / 90 (0,00%)	3 / 35 (8,57%)

Fig. 3

A

JCM 5805



B

JCM 20101

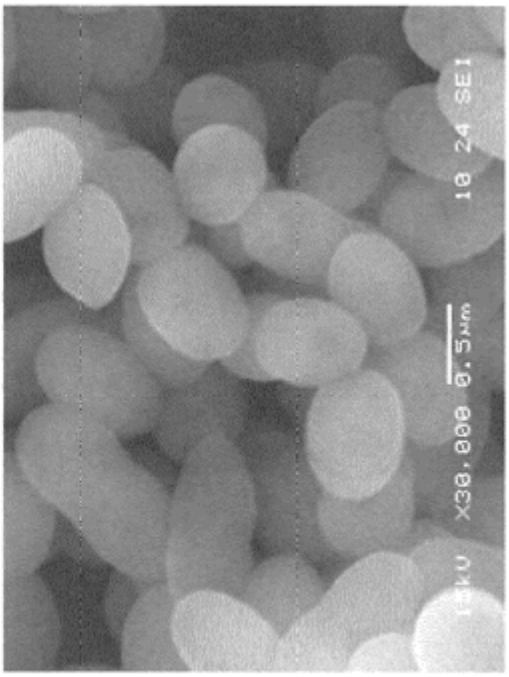


Fig. 4

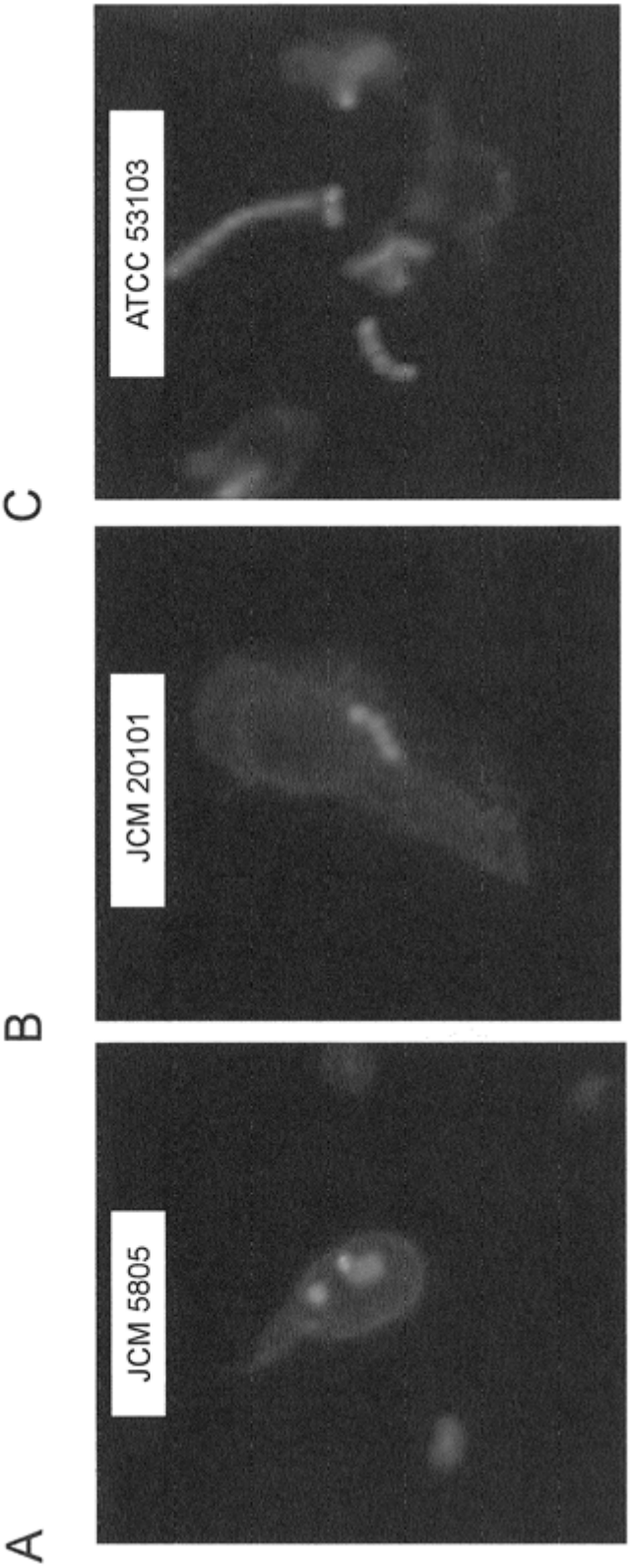


Fig. 5A

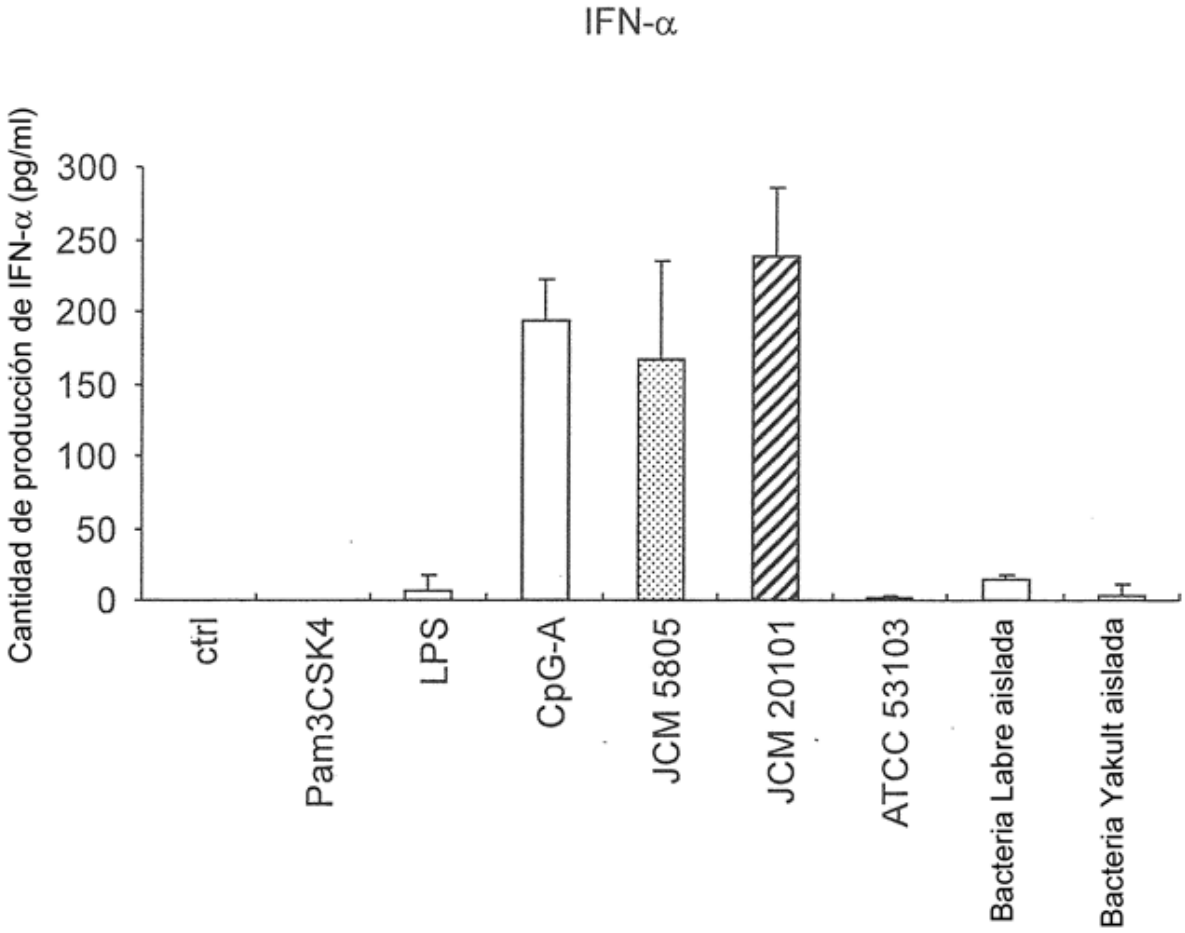

IFN-α
Cantidad de producción de IFN-α (pg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
ctrl
Pam3CSK4
LPS
CpG-A
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103
Bacteria Labre aislada
Bacteria Yakult aislada

Fig. 5B

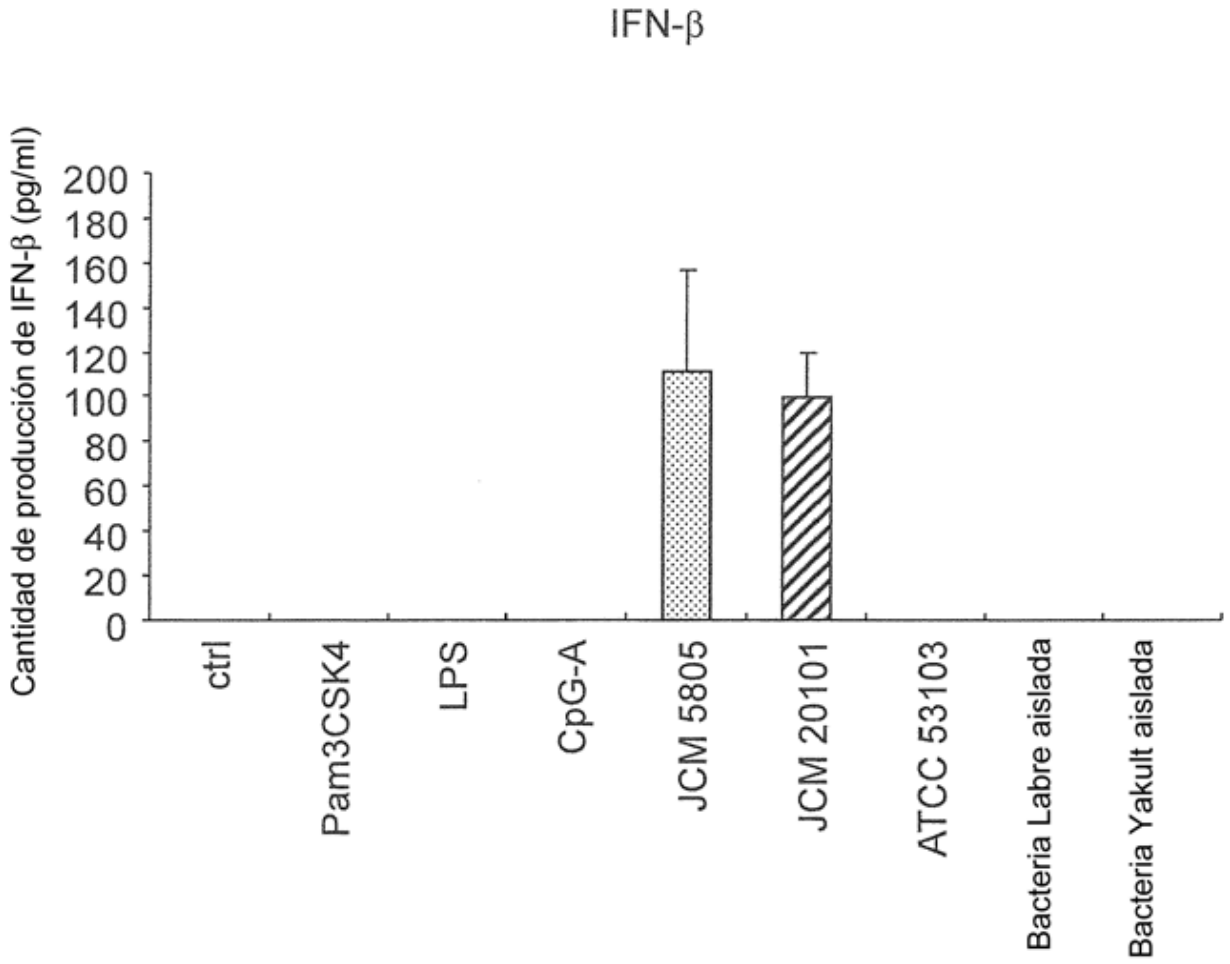

IFN-β
Cantidad de producción de IFN-β (pg/ml)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ctrl
Pam3CSK4
LPS
CpG-A
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103
Bacteria Labre aislada
Bacteria Yakult aislada

Fig. 5C

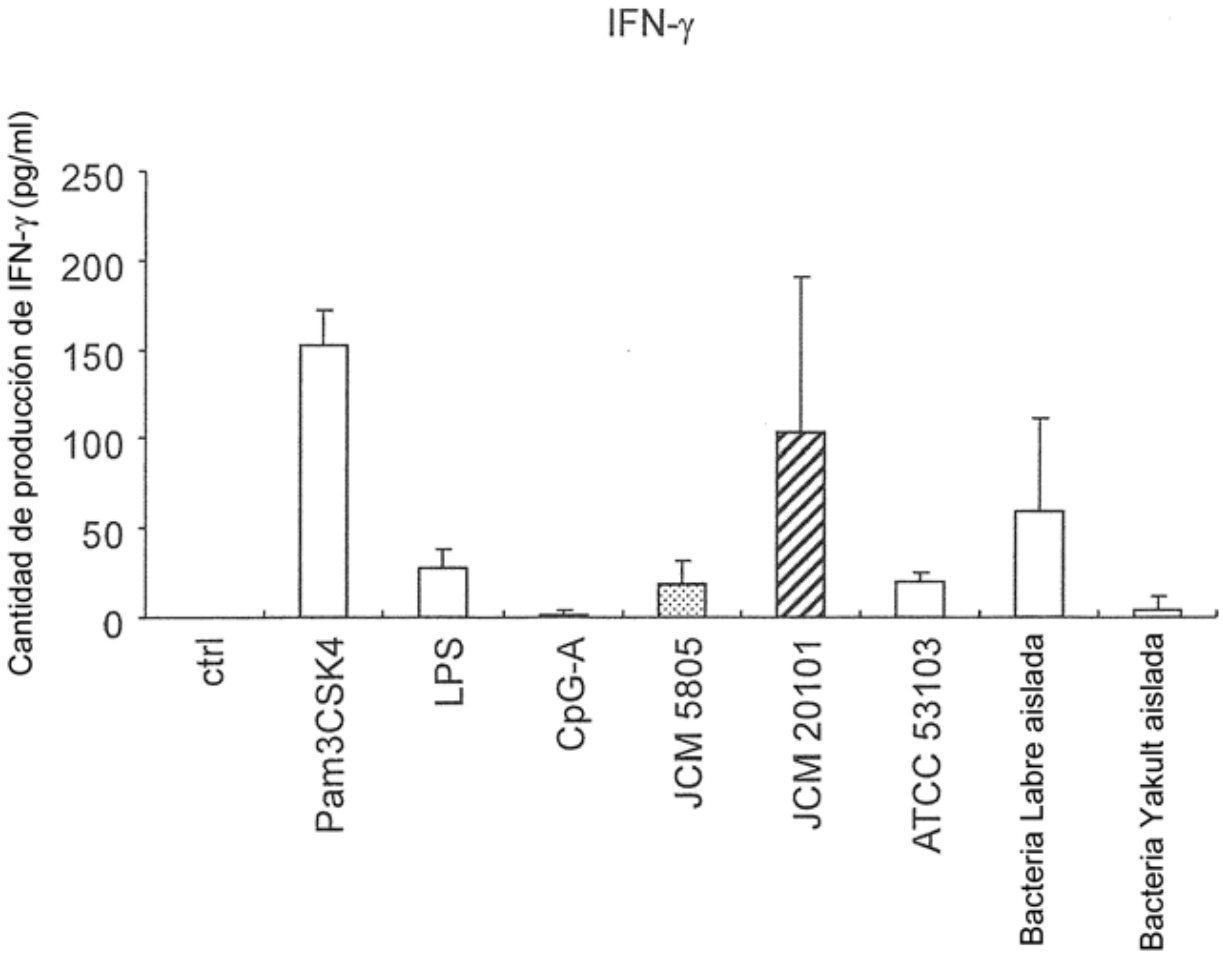

IFN-γ
Cantidad de producción de IFN-γ (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
ctrl
Pam3CSK4
LPS
CpG-A
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103
Bacteria Labre aislada
Bacteria Yakult aislada

Fig. 5D

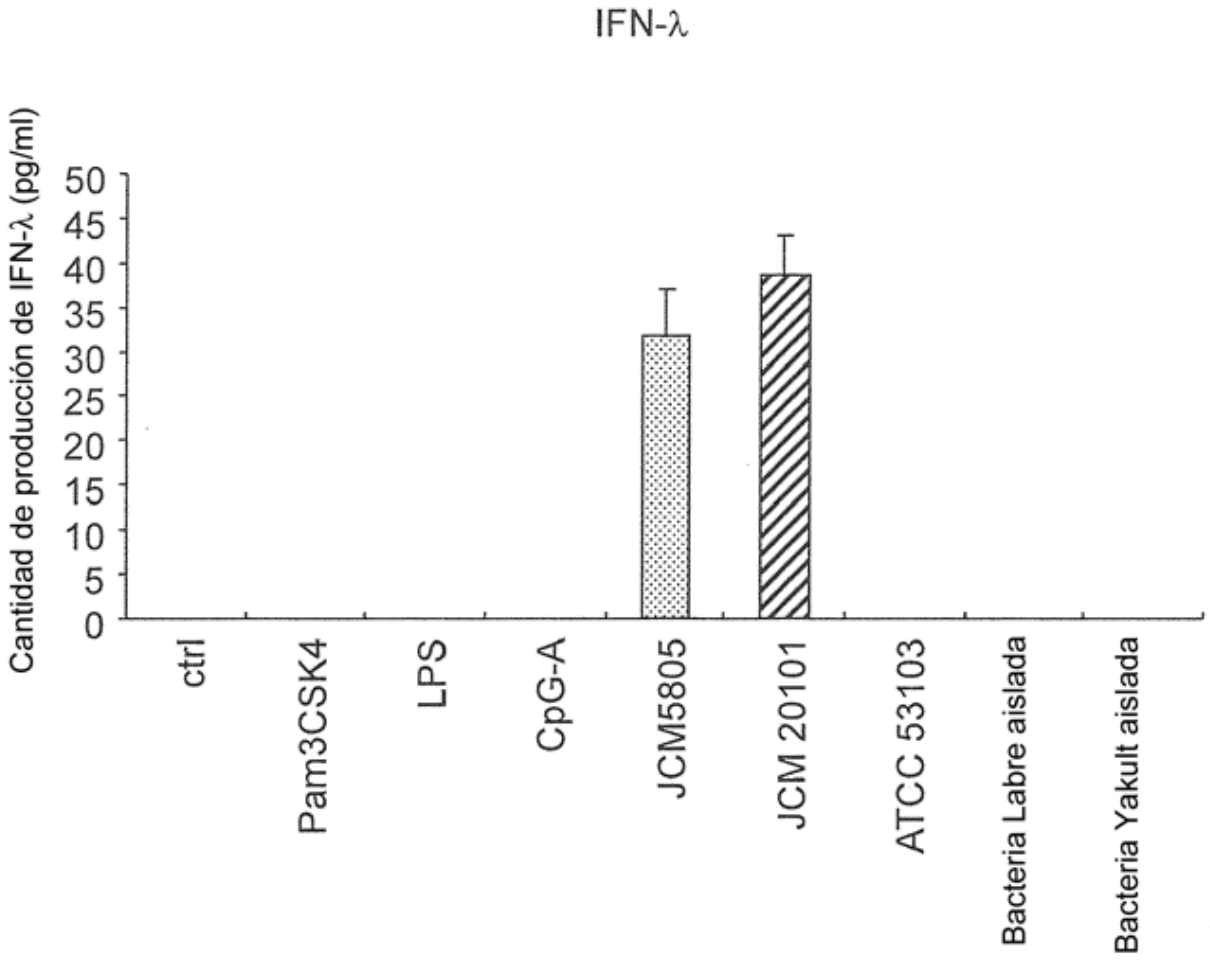

IFN-λ
Cantidad de producción de IFN-λ (pg/ml)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
ctrl
Pam3CSK4
LPS
CpG-A
JCM5805
JCM 20101
ATCC 53103
Bacteria Labre aislada
Bacteria Yakult aislada

Fig. 6A

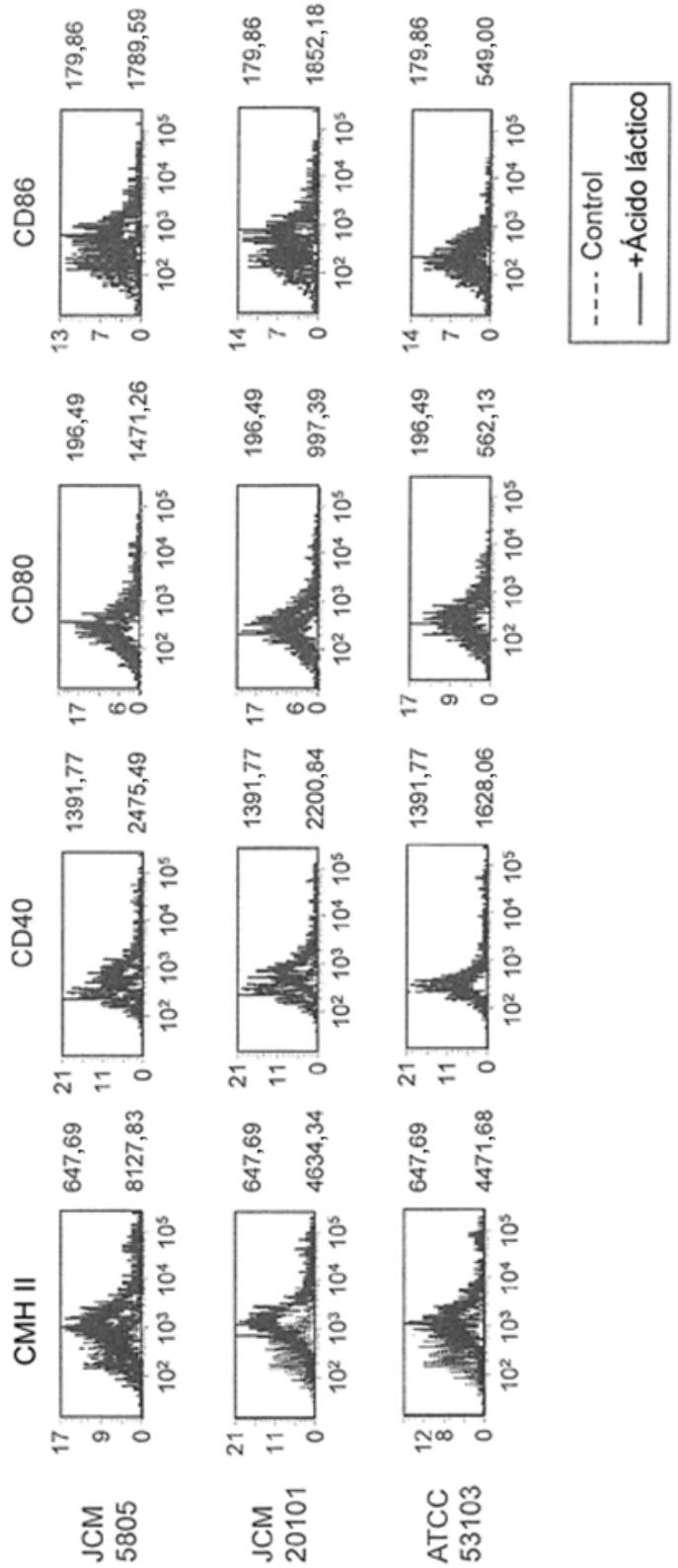

CMH II
CD40
CD80
CD86
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103
647,69
8127,83
1391,77
2475,49
196,49
1471,26
179,86
1789,59
647,69
4634,34
1391,77
2200,84
196,49
997,39
179,86
1852,18
647,69
4471,68
1391,77
1628,06
196,49
562,13
179,86
549,00
Control
+Ácido láctico

Fig. 6B

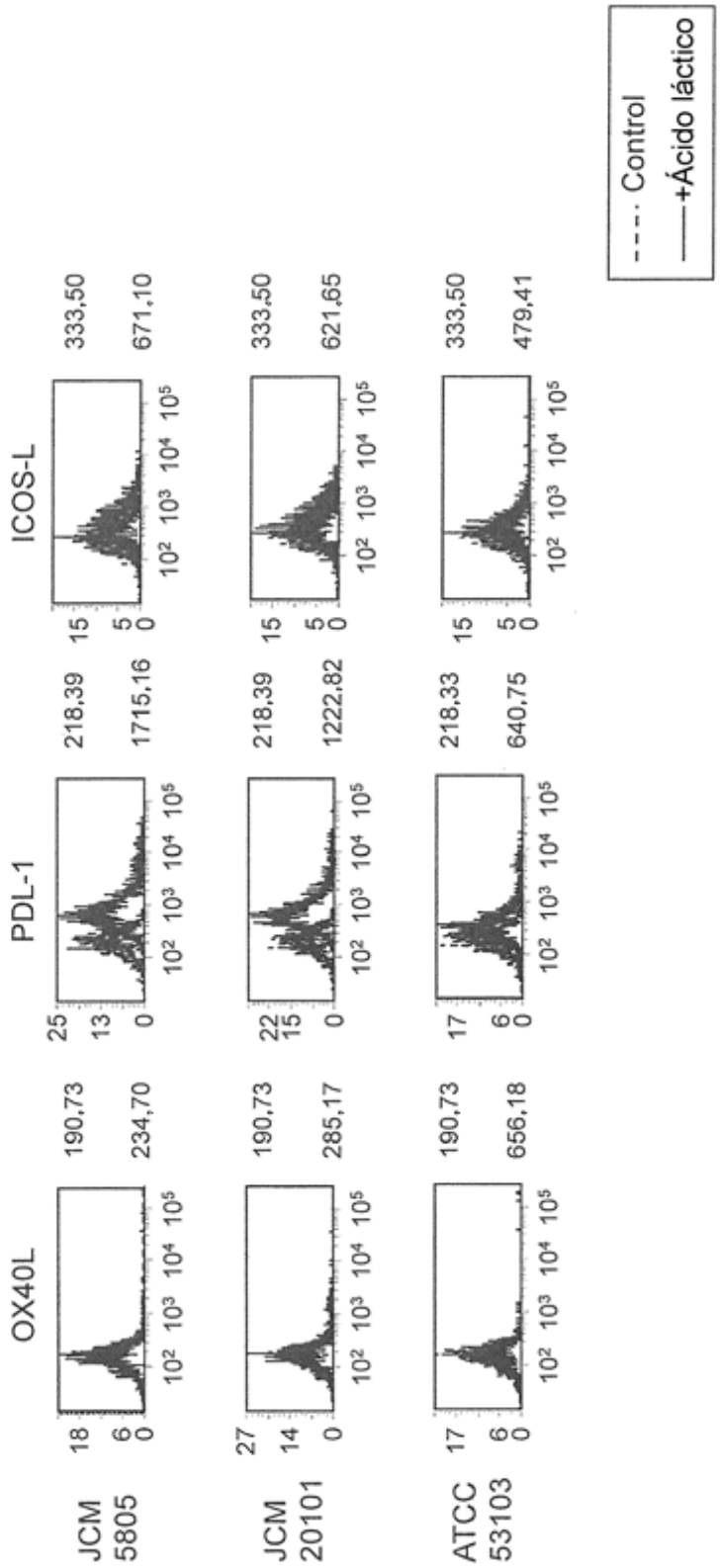

OX40L
PDL-1
ICOS-L
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103
18
6
0
190,73
234,70
25
13
0
218,39
1715,16
15
5
0
333,50
671,10
27
14
0
190,73
285,17
22
15
0
218,39
1222,82
15
5
0
333,50
621,65
17
6
0
190,73
656,18
17
6
0
218,33
640,75
15
5
0
333,50
479,41
10² 10³ 10⁴ 10⁵
---- Control
——+Ácido láctico

Fig. 7

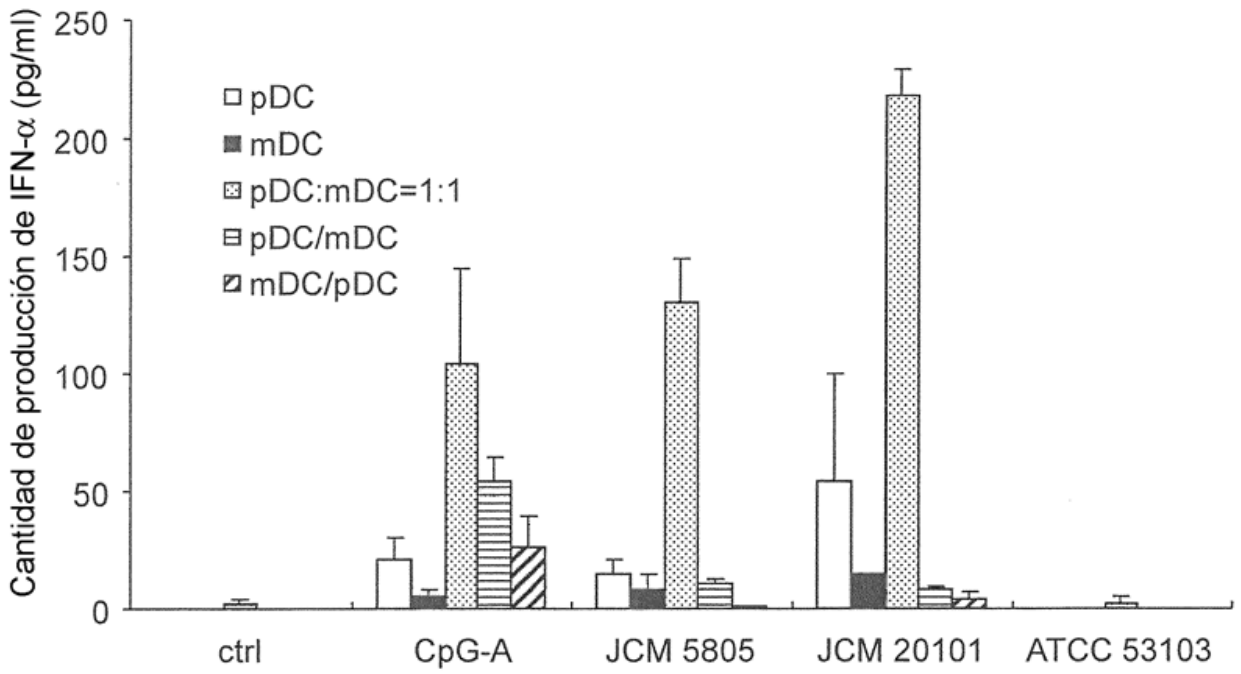

Cantidad de producción de IFN-α (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
pDC
mDC
pDC:mDC=1:1
pDC/mDC
mDC/pDC
ctrl
CpG-A
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103

Fig. 8

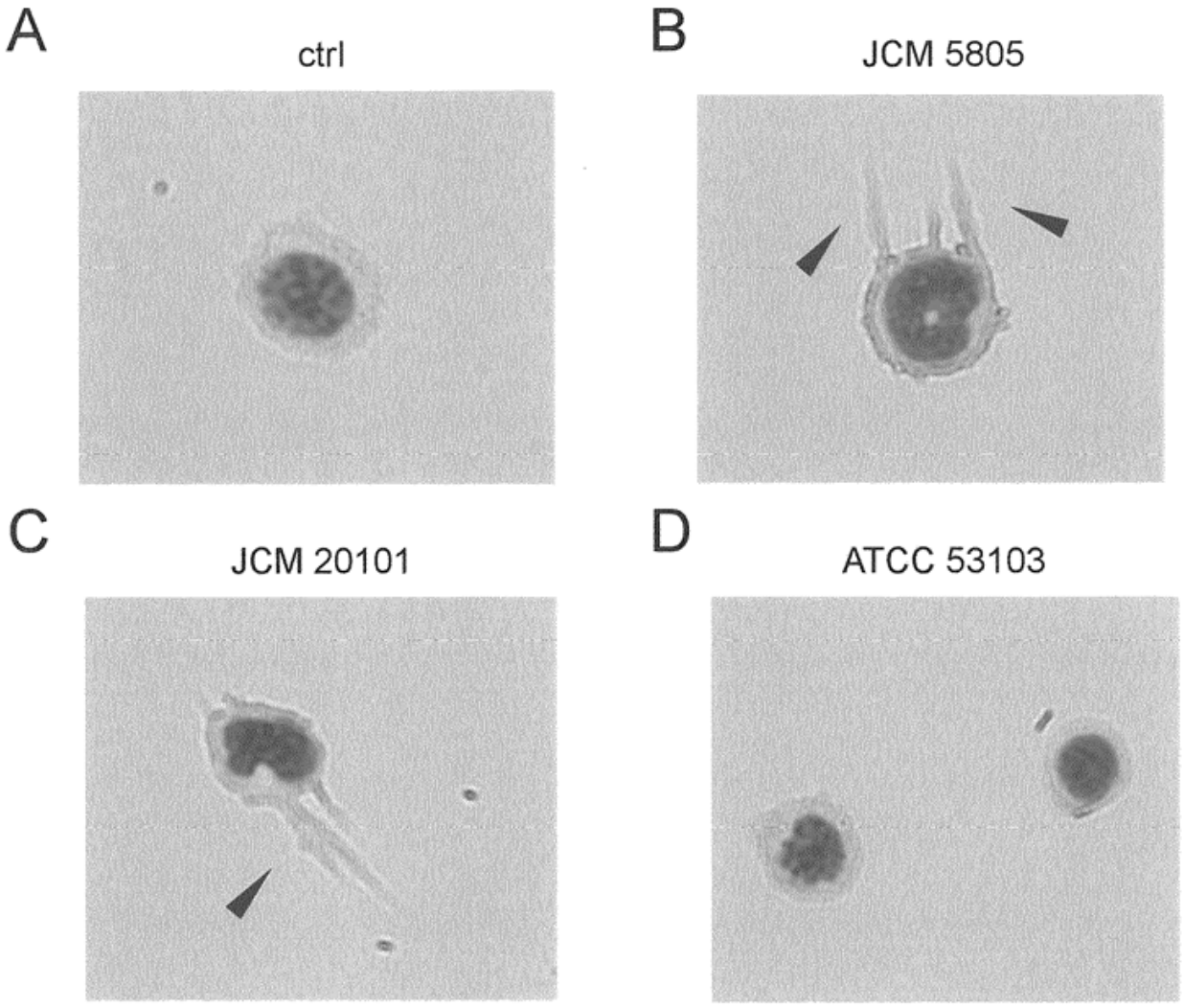


Fig. 9A

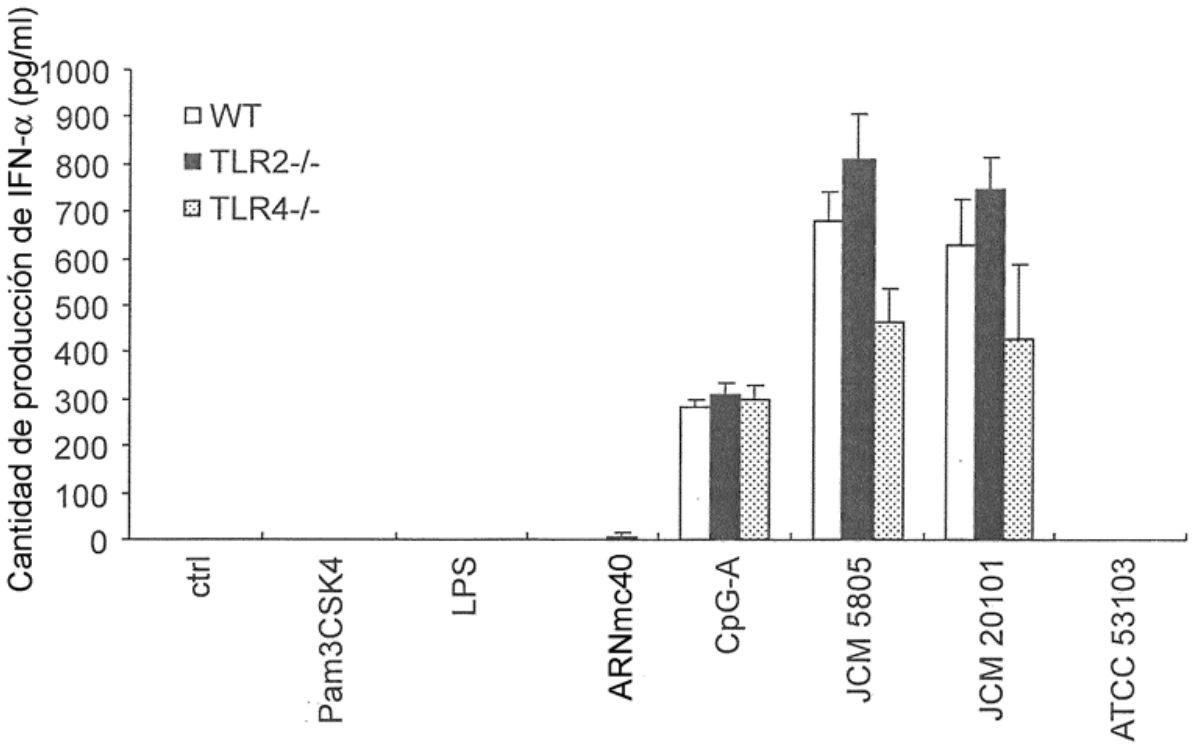
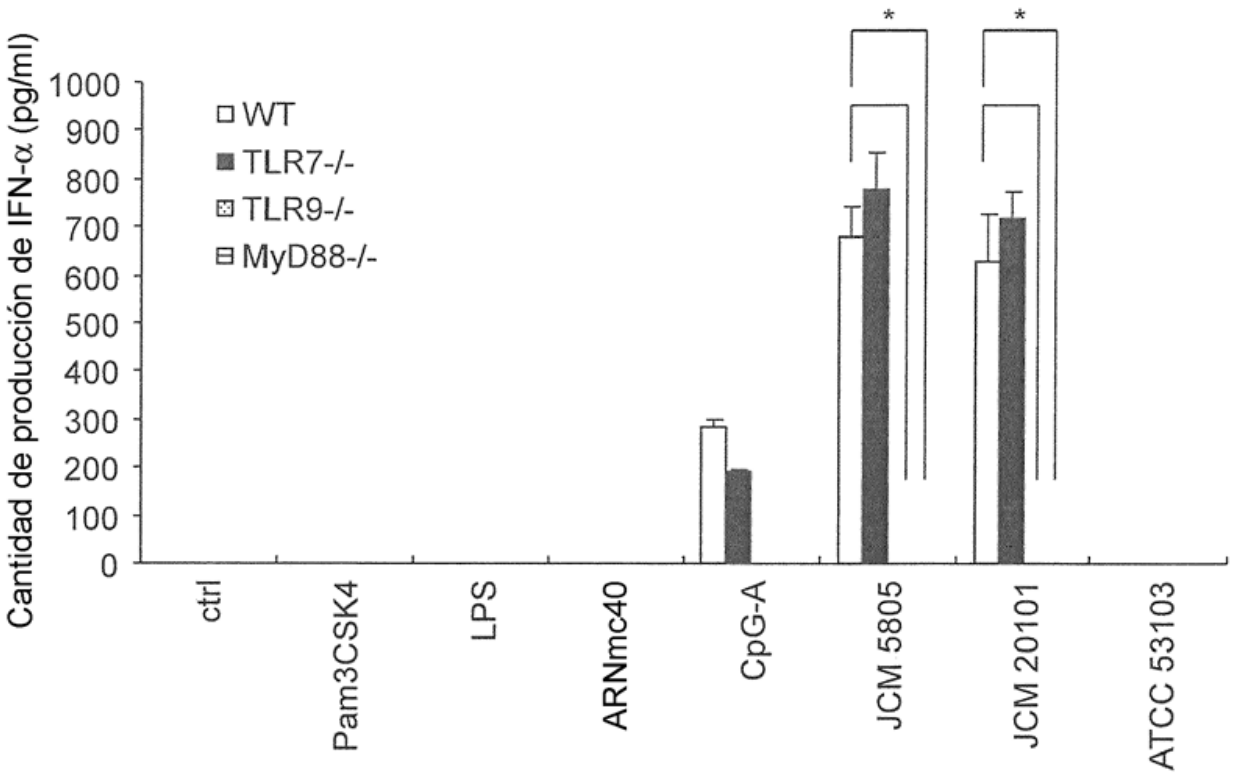

Cantidad de producción de IFN-α (pg/ml)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
WT
TLR2-/-
TLR4-/-
ctrl
Pam3CSK4
LPS
ARNmc40
CpG-A
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103

Fig. 9B



En comparación con WT *: p < 0,01

Fig. 10

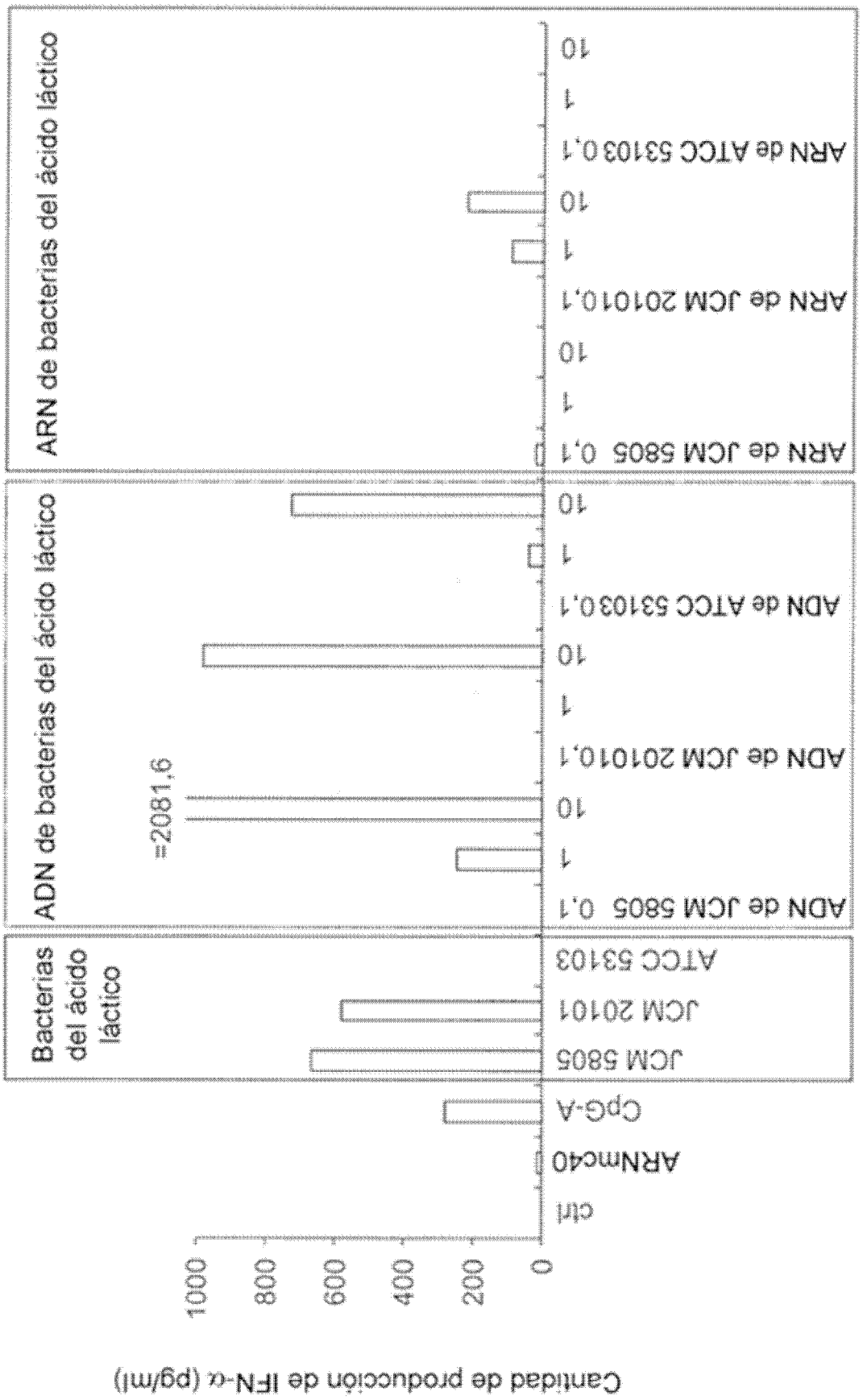

Cantidad de producción de IFN-α (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
ctrl
ARNmc40
CpG-A
JCM 5805
JCM 20101
ATCC 53103
Bacterias del ácido láctico
ADN de JCM 5805 0,1
1
10
ADN de JCM 20101 0,1
1
10
ADN de ATCC 53103 0,1
1
10
=2081,6
ADN de bacterias del ácido láctico
ARN de JCM 5805 0,1
1
10
ARN de JCM 20101 0,1
1
10
ARN de ATCC 53103 0,1
1
10
ARN de bacterias del ácido láctico

Fig. 11

Método de administración: alimentación mixta de JCM 5805 y ATCC 53103 (calentada) a 10 mg/día

Duración de la administración: 1 semana

Grupos (n = 6):
- grupo de control
- grupo de JCM 5805
- grupo de ATCC 53103

Puntos de evaluación: cantidad de producción de IFN-α en la sangre, marcador de activación de pDC (CMH de clase II ˙ CD86)

Programa:

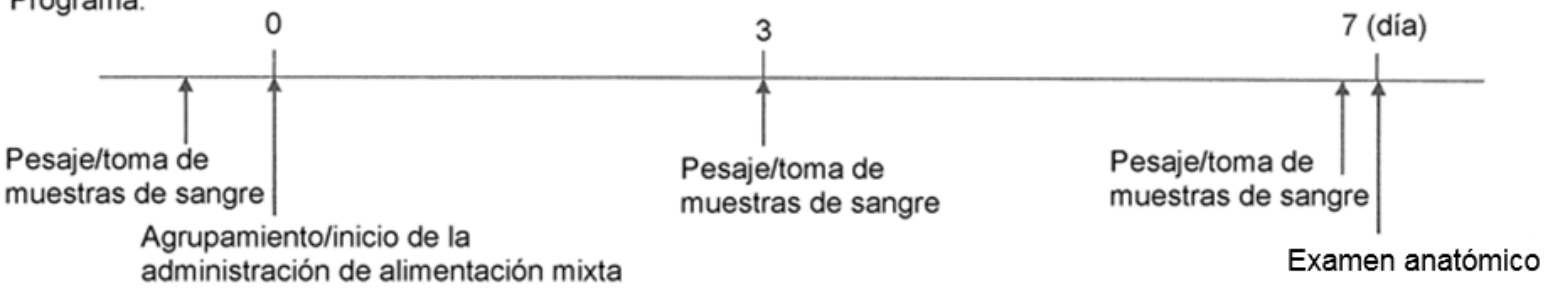


Fig. 12

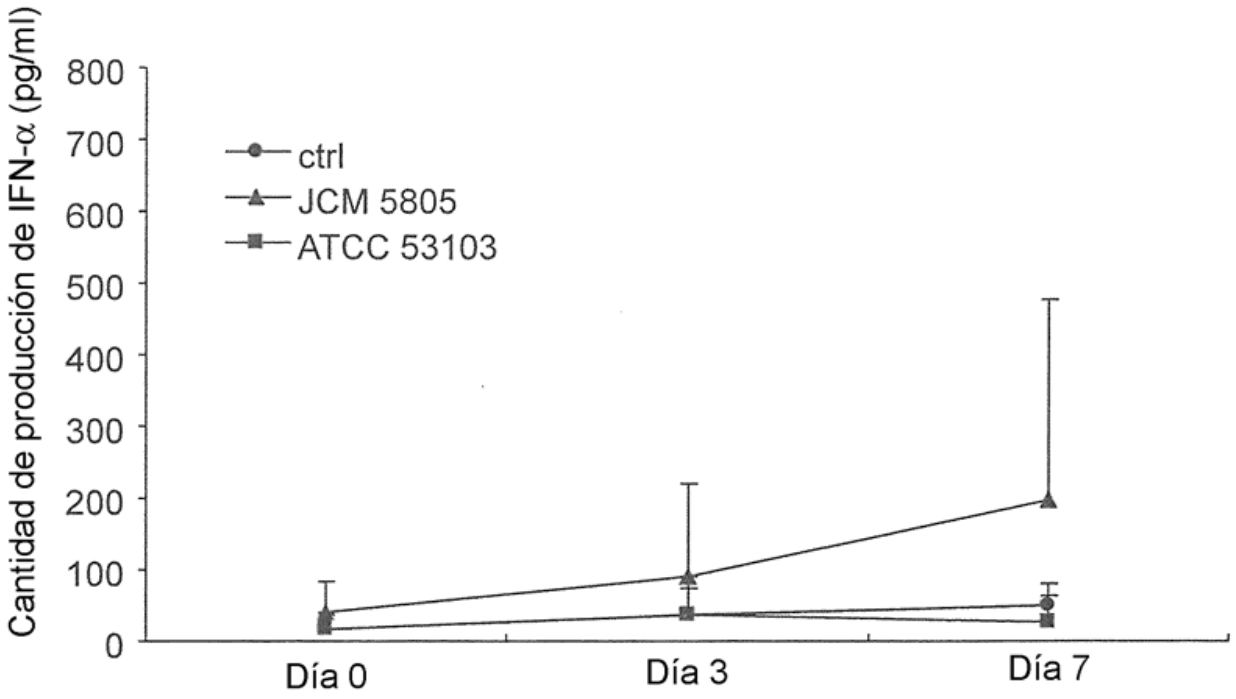

Cantidad de producción de IFN-α (pg/ml)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
ctrl
JCM 5805
ATCC 53103
Día 0
Día 3
Día 7

Fig. 13A

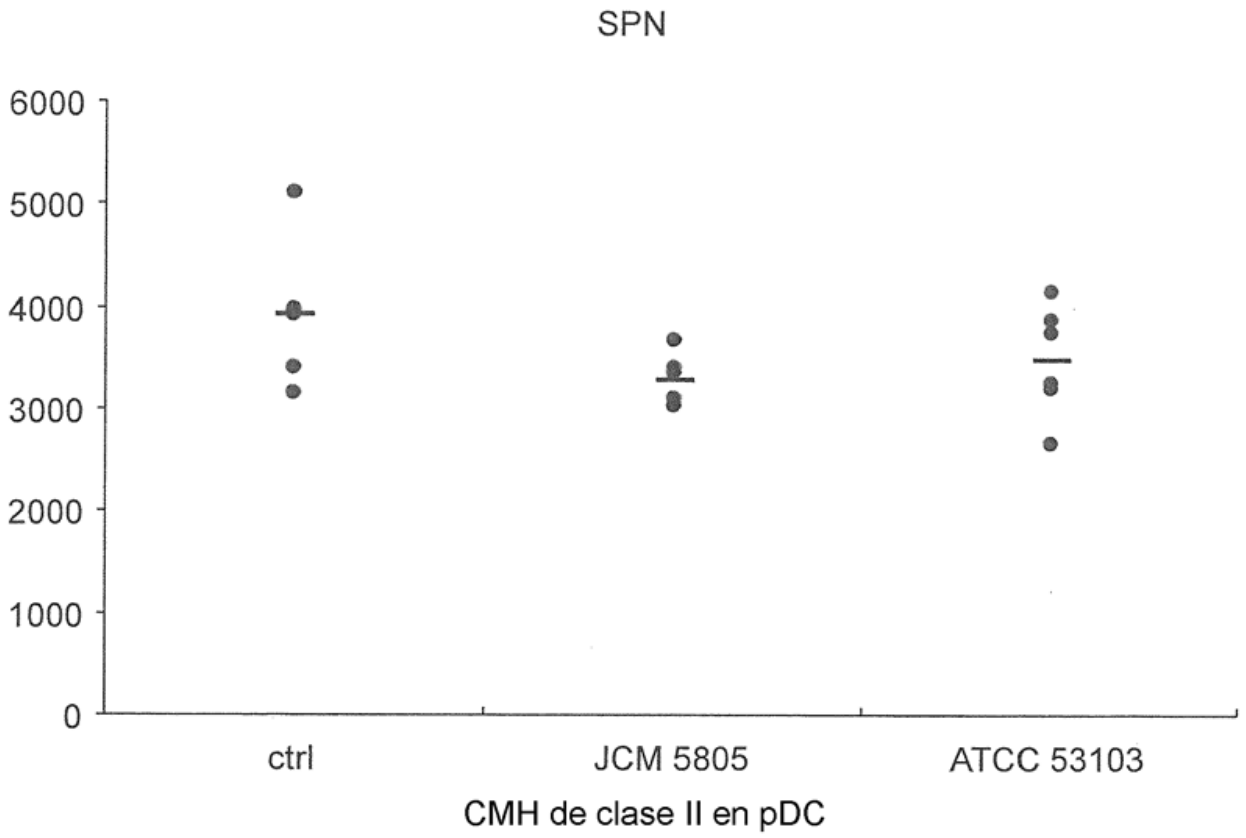

SPN
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
ctrl
JCM 5805
ATCC 53103
CMH de clase II en pDC

Fig. 13B

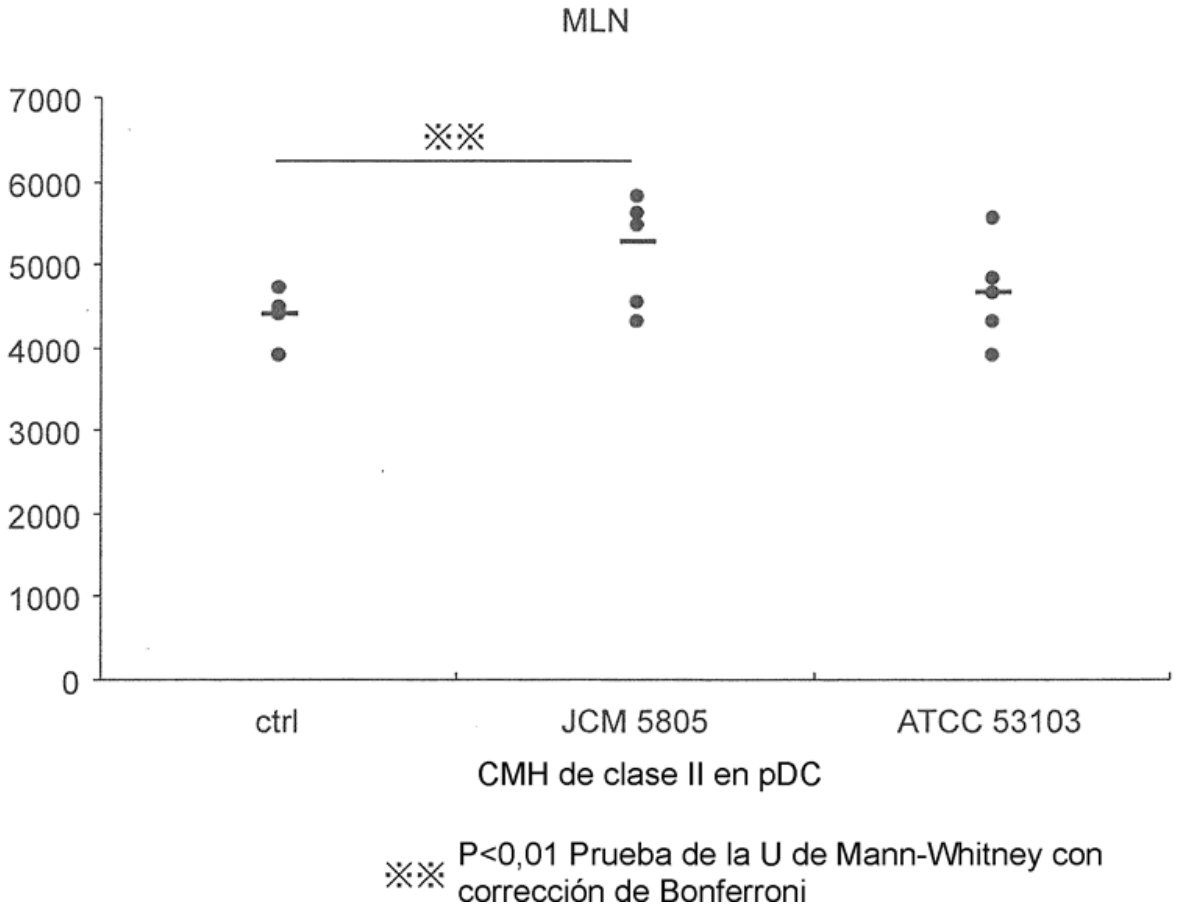

MLN
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
※※
ctrl
JCM 5805
ATCC 53103
CMH de clase II en pDC
※※ P<0,01 Prueba de la U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni

Fig. 13C

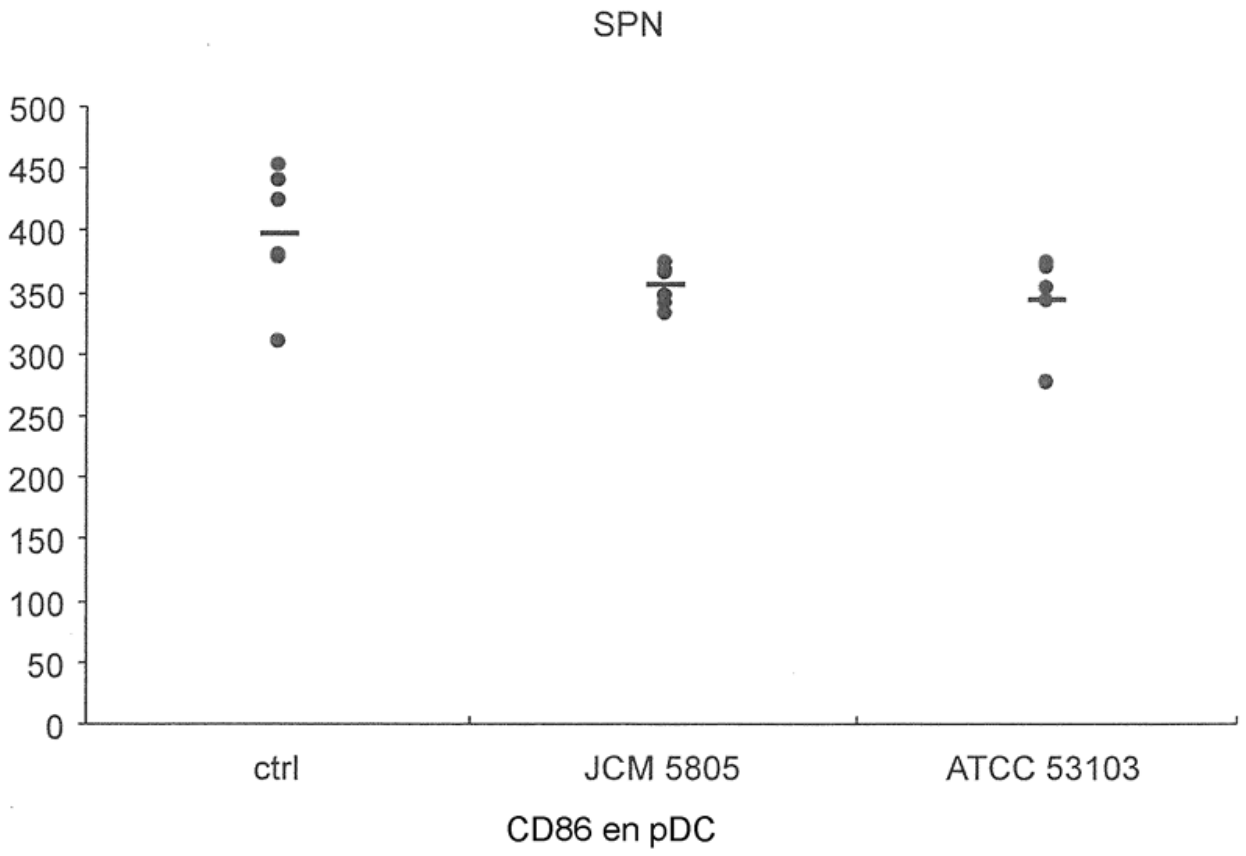
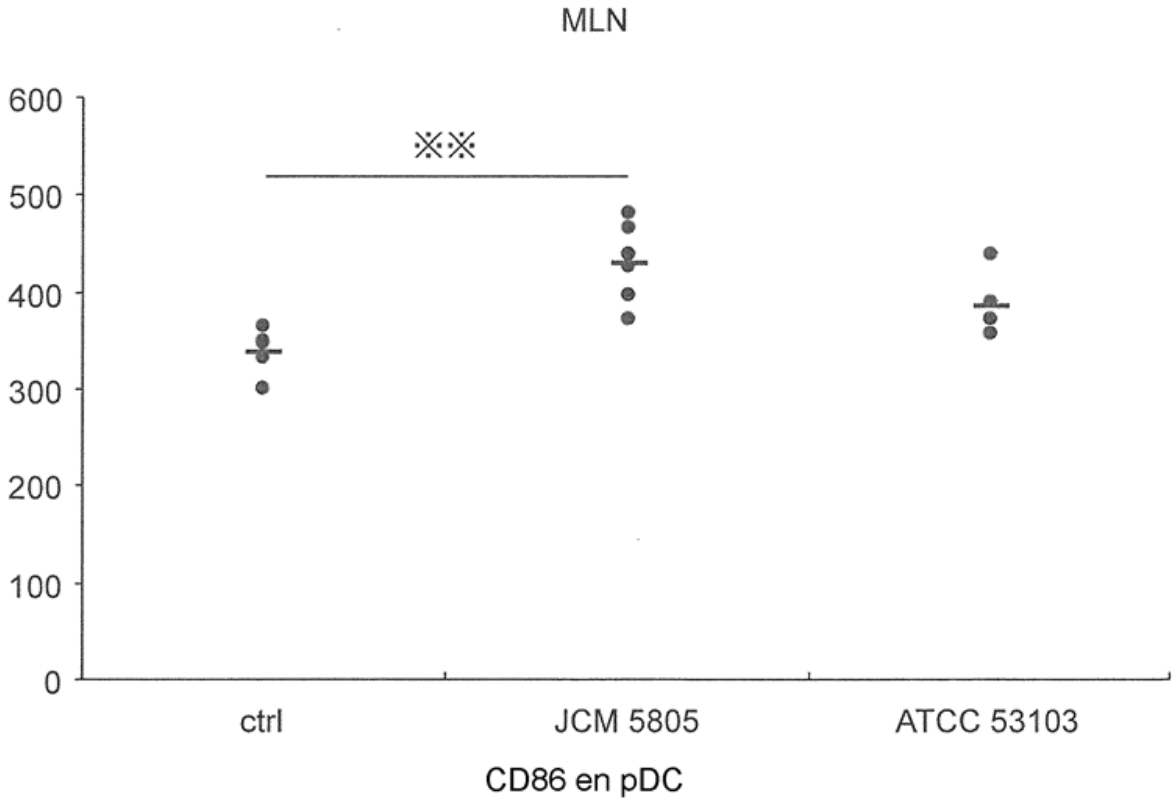

SPN
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
ctrl
JCM 5805
ATCC 53103
CD86 en pDC

Fig. 13D



※※ P<0,01 Prueba de la U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni

Fig. 14

Método de administración: JCM 5805 (calentado) a 10 mg/día

Duración de la administración: 2 semanas

Grupos (n = 6):
- grupo de ctrl + agente inmunosupresor
- grupo de JCM 5805 + agente inmunosupresor

Puntos de evaluación: Peso corporal, cantidad de producción de IFN-α en sangre
marcador de activación de pDC (CMH de clase II • CD86))

Programa:

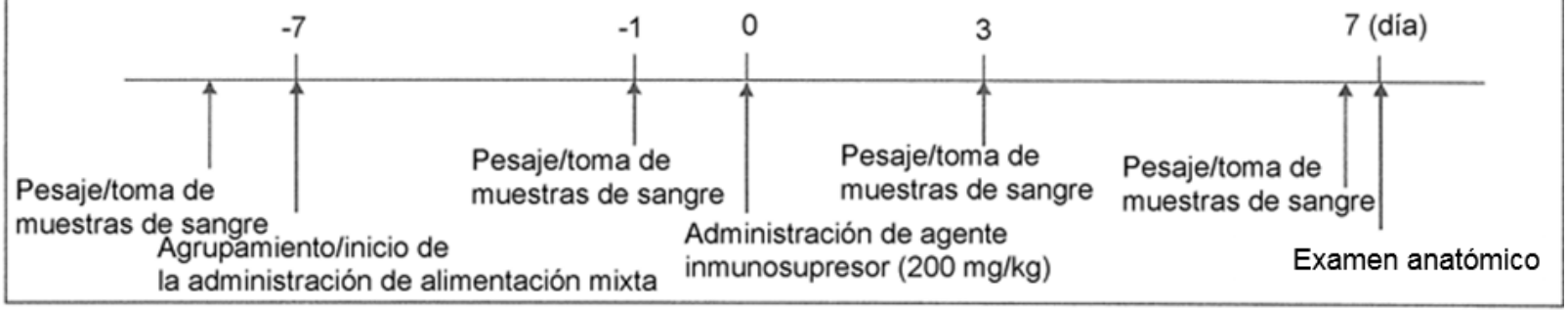


Fig. 15A

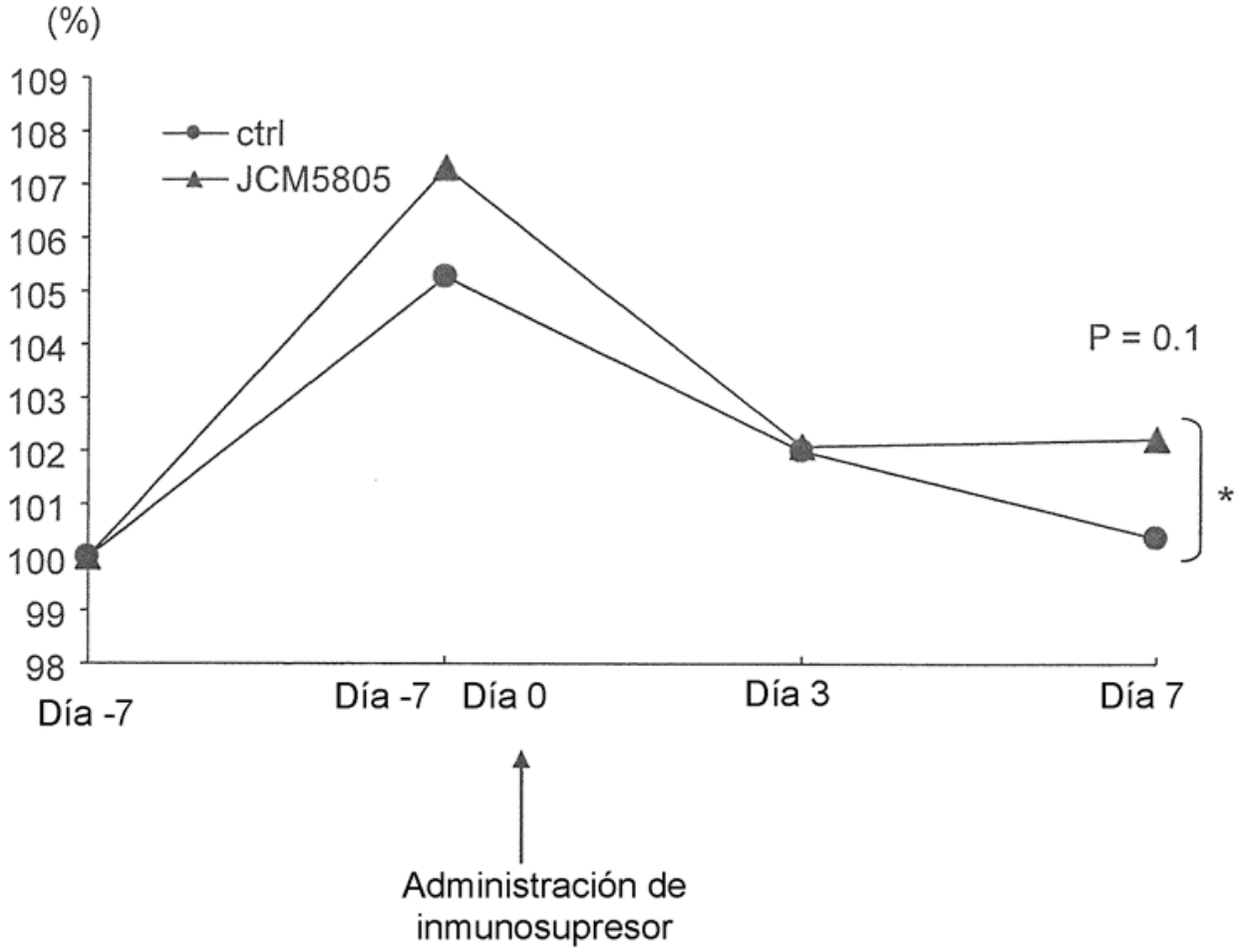

(%)
109
108
107
106
105
104
103
102
101
100
99
98
ctrl
JCM5805
P = 0.1
*
Día -7
Día -7
Día 0
Día 3
Día 7
Administración de
inmunosupresor

Fig. 15B

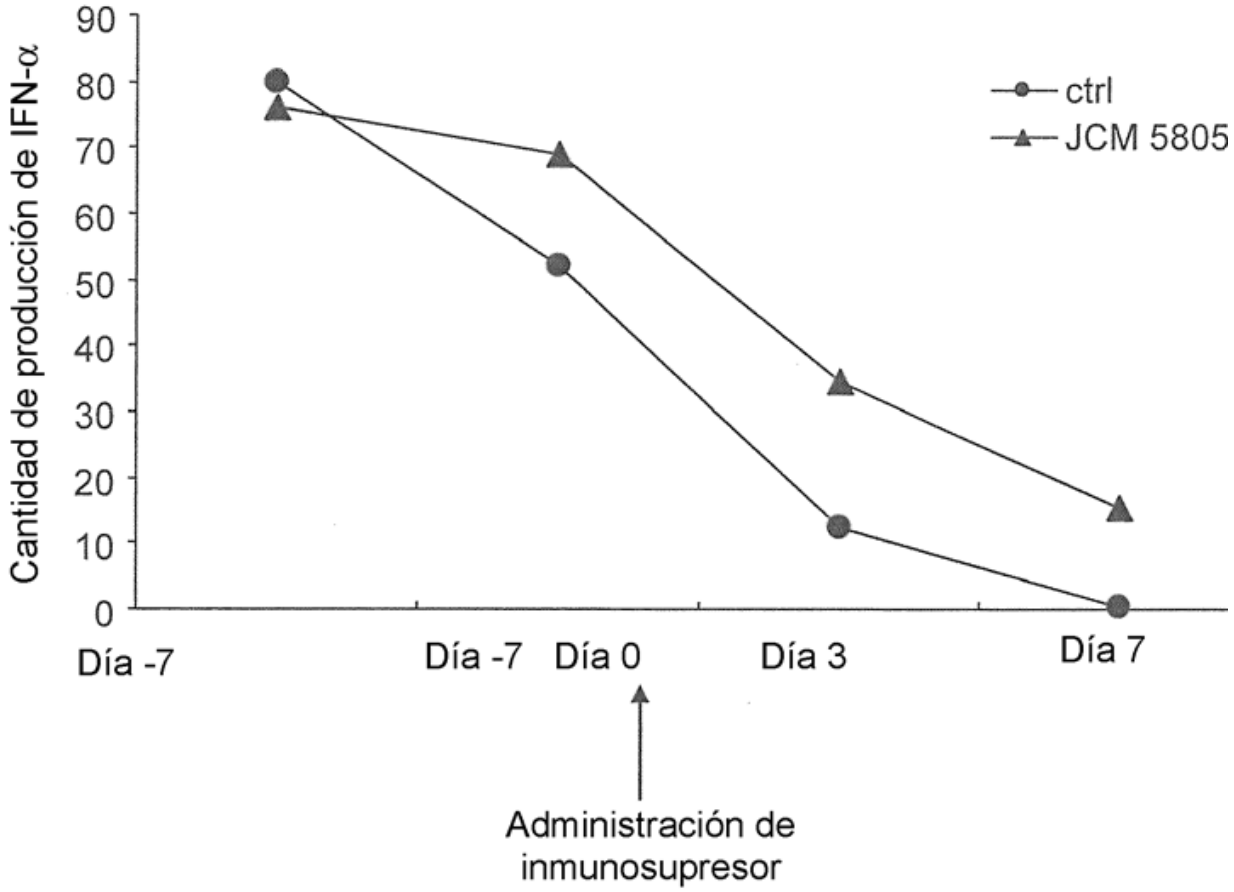
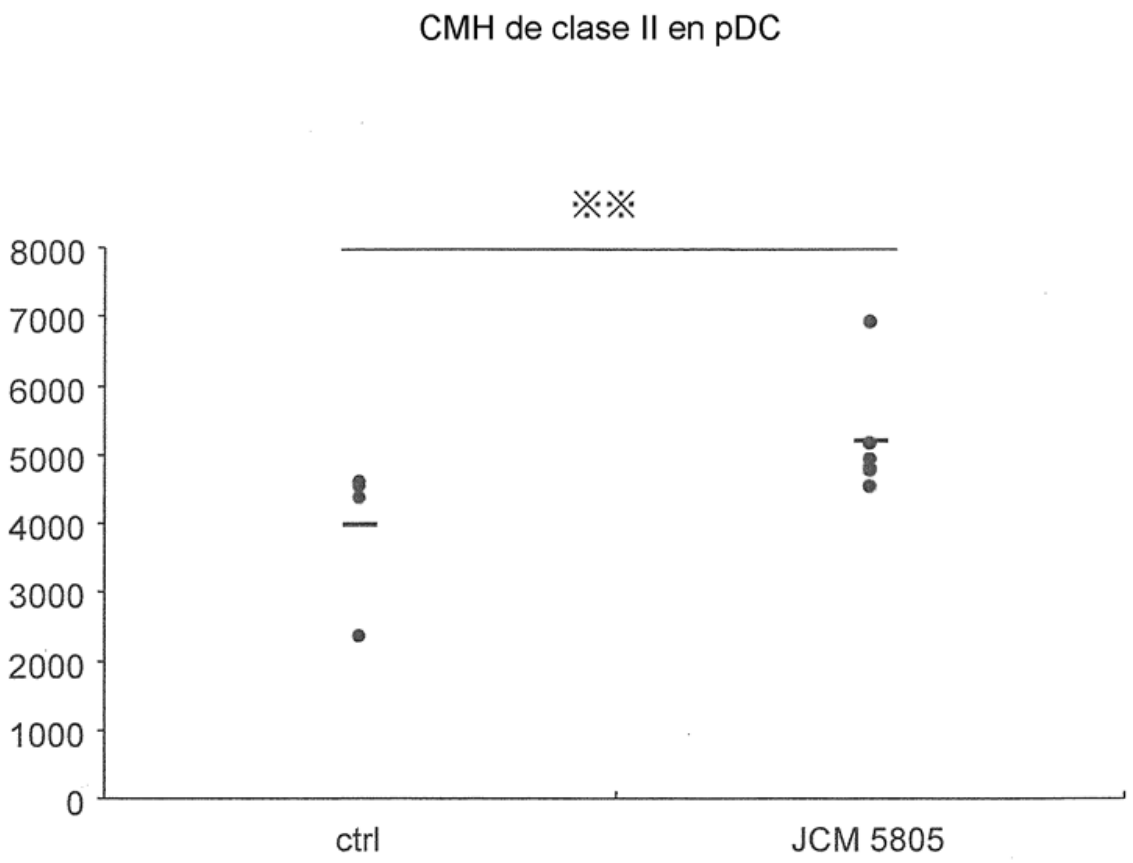
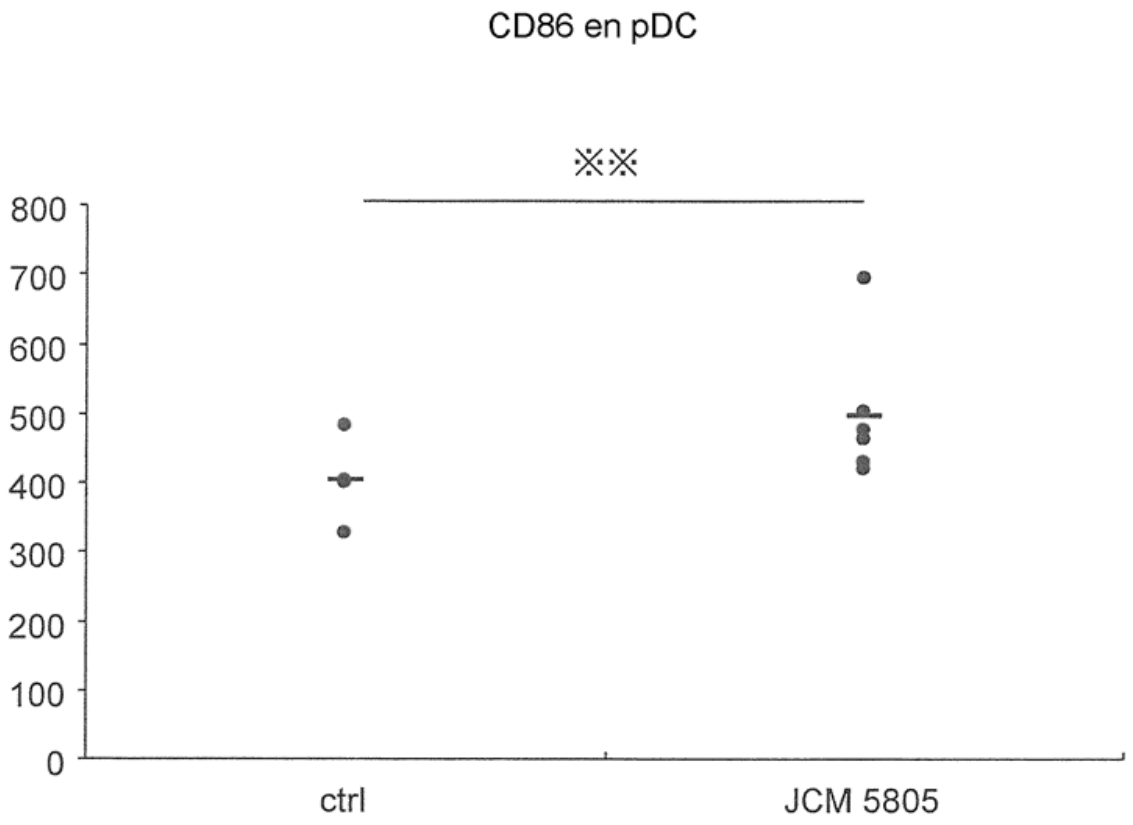

Cantidad de producción de IFN-α
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ctrl
JCM 5805
Día -7
Día -7
Día 0
Día 3
Día 7
Administración de inmunosupresor

Fig. 16A



※※ P<0,01 Prueba de la U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni

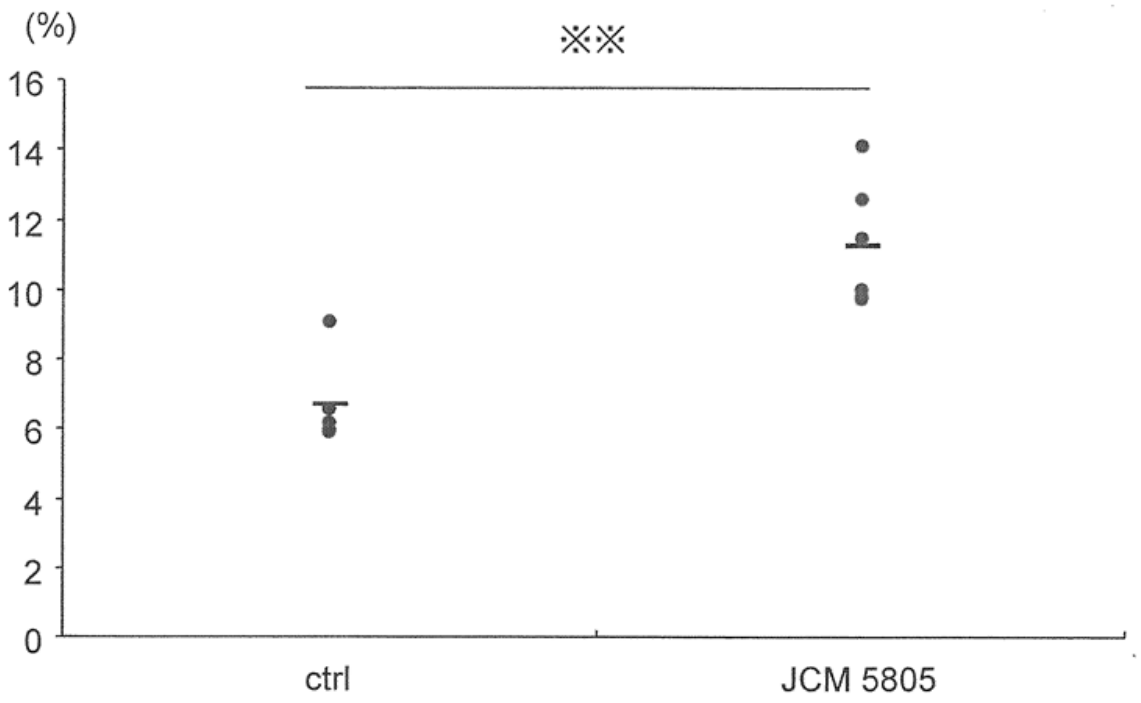
Fig. 16B



※※ P<0,01 Prueba de la U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni

Fig. 16C

Porcentaje de pDC



※※ P<0,01 Prueba de la U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni

Fig. 16D

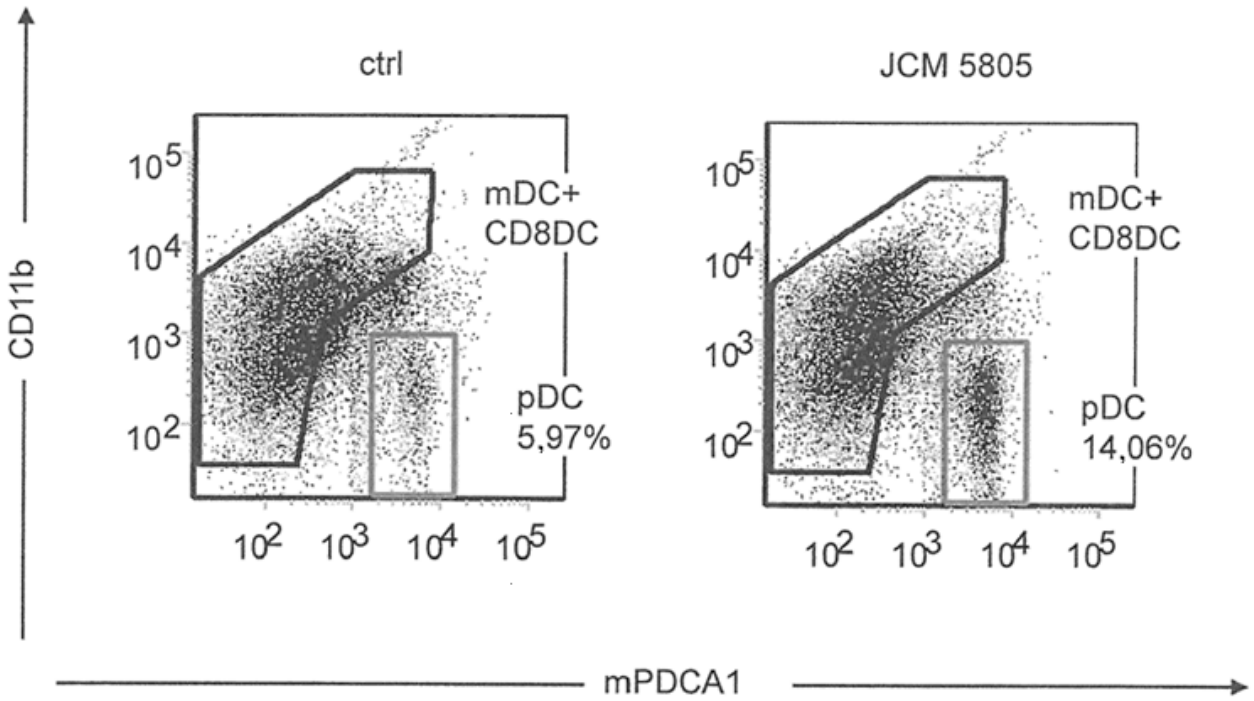

ctrl
JCM 5805
CD11b
mPDCA1
mDC+
CD8DC
pDC
5,97%
pDC
14,06%
10^2
10^3
10^4
10^5

Fig. 17

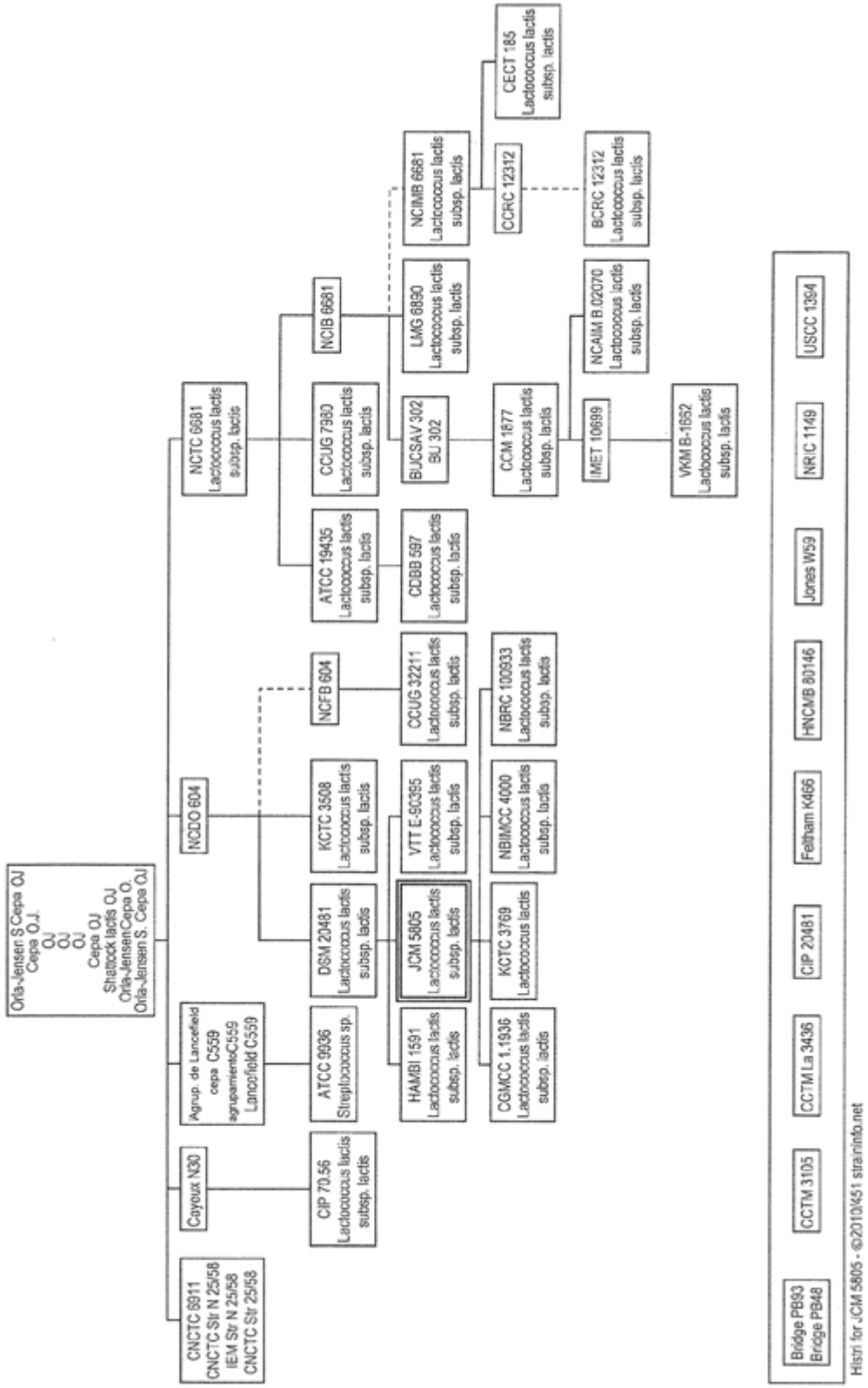

Orla-Jensen S Cepa OJ
Cepa O.J.
OJ
OJ
OJ
Cepa OJ
Shattock lactis OJ
Orla-Jensen Cepa O.
Orla-Jensen S. Cepa OJ
CNCTC 6911
CNCTC Str N 25/58
IEM Str N 25/58
CNCTC Str 25/58
Cayeux N30
CIP 70.56
Lactococcus lactis
subsp. lactis
Agrup. de Lancefield
cepa C559
agrupamiento C559
Lancefield C559
ATCC 9936
Streptococcus sp.
NCDO 604
DSM 20481
Lactococcus lactis
subsp. lactis
KCTC 3508
Lactococcus lactis
subsp. lactis
NCFB 604
NCTC 6681
Lactococcus lactis
subsp. lactis
ATCC 19435
Lactococcus lactis
subsp. lactis
CCUG 7930
Lactococcus lactis
subsp. lactis
NCIB 6681
HAMBI 1591
Lactococcus lactis
subsp. lactis
JCM 5805
Lactococcus lactis
subsp. lactis
VTT E-90355
Lactococcus lactis
subsp. lactis
CCUG 32211
Lactococcus lactis
subsp. lactis
CDBB 597
Lactococcus lactis
subsp. lactis
BUCSAV 302
BU 302
LMG 6890
Lactococcus lactis
subsp. lactis
NCIMB 6681
Lactococcus lactis
subsp. lactis
CGMCC 1.1936
Lactococcus lactis
subsp. lactis
KCTC 3769
Lactococcus lactis
NBIMCC 4000
Lactococcus lactis
subsp. lactis
NBRC 100933
Lactococcus lactis
subsp. lactis
CCM 1877
Lactococcus lactis
subsp. lactis
CCRC 12312
CECT 185
Lactococcus lactis
subsp. lactis
IMET 10689
VKM B-1652
Lactococcus lactis
subsp. lactis
NCAIM B.02070
Lactococcus lactis
subsp. lactis
BCRC 12312
Lactococcus lactis
subsp. lactis
Bridge PB93
Bridge PB48
CCTM 3105
CCTM La 3436
CIP 20481
Feltham K466
HNCMB 80146
Jones W59
NRIC 1149
USCC 1394
Histri for JCM 5805 - ©2010/451 strainfo.net

Fig. 18

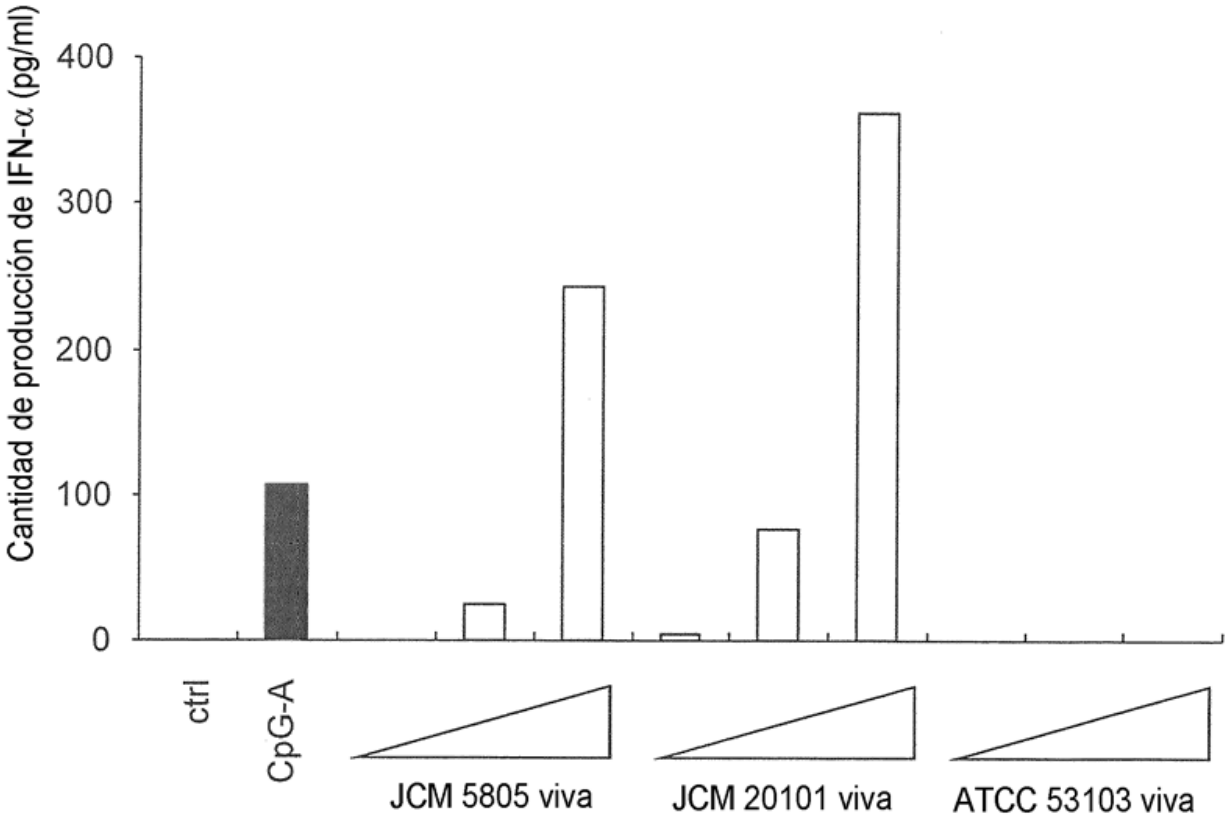

Cantidad de producción de IFN-α (pg/ml)
400
300
200
100
0
ctrl
CpG-A
JCM 5805 viva
JCM 20101 viva
ATCC 53103 viva

Fig. 19A

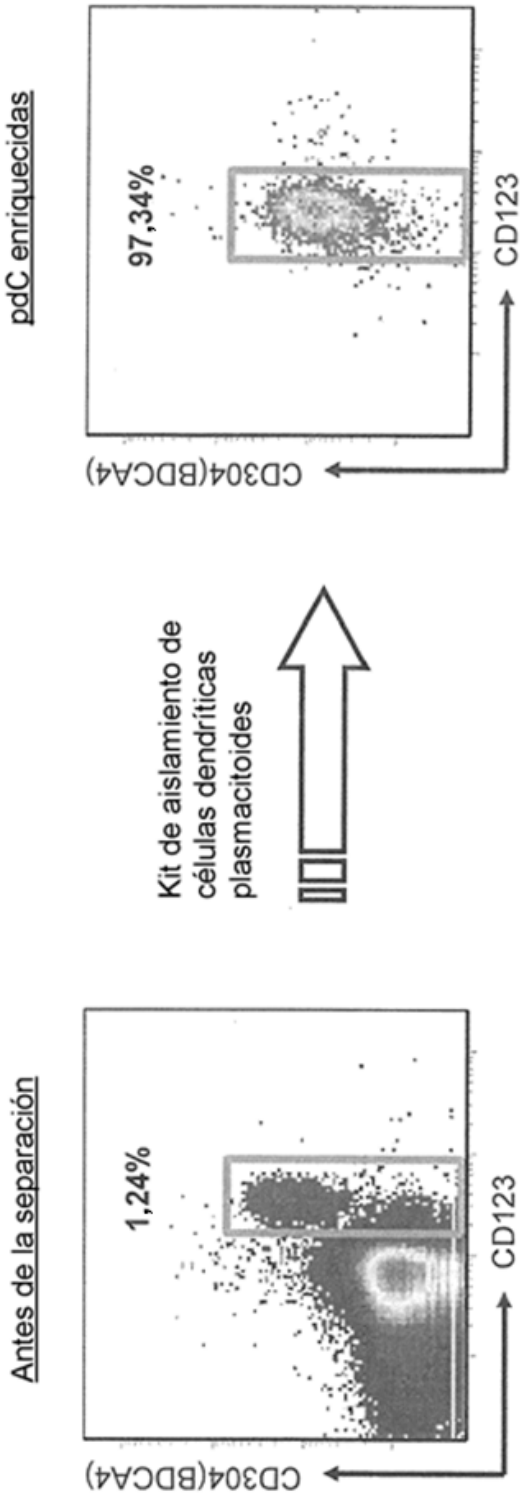

Antes de la separación
1,24%
CD304(BDCA4)
CD123
Kit de aislamiento de células dendríticas plasmacitoides
pdC enriquecidas
97,34%
CD304(BDCA4)
CD123

Fig. 19B

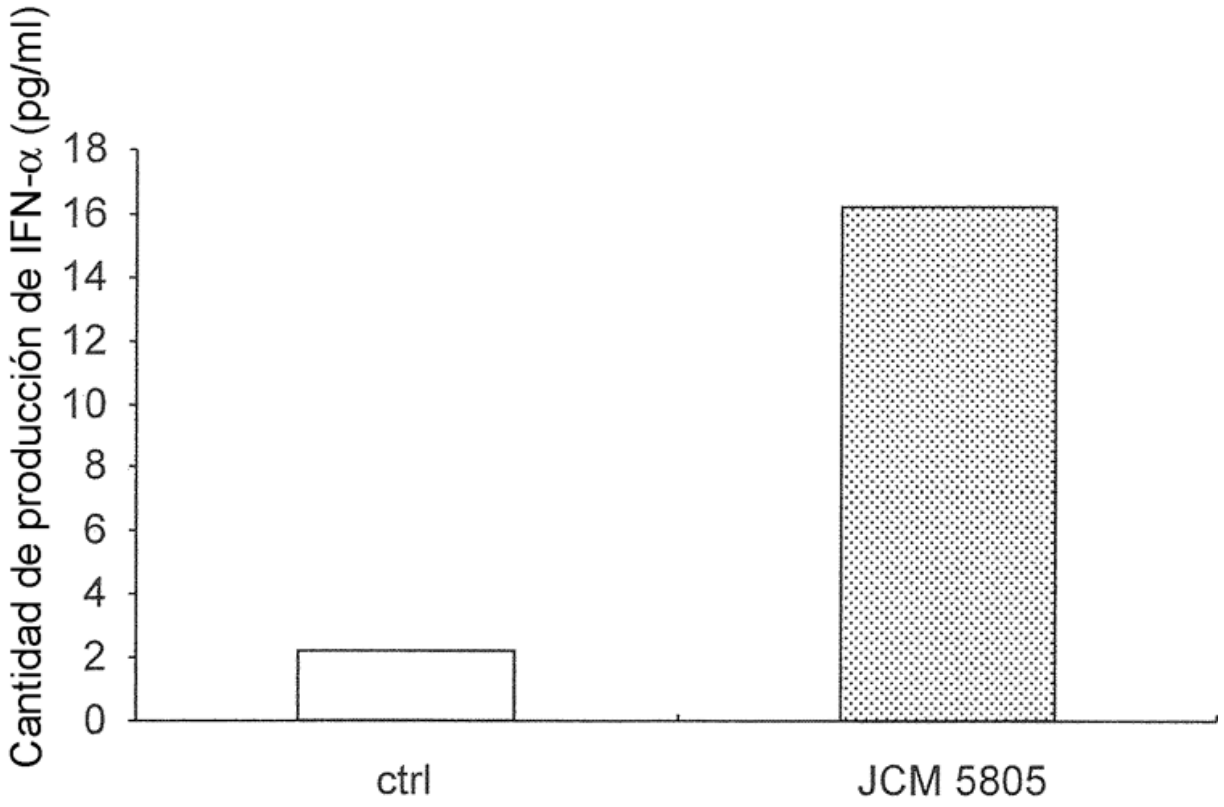

Cantidad de producción de IFN-α (pg/ml)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ctrl
JCM 5805

Fig. 19C

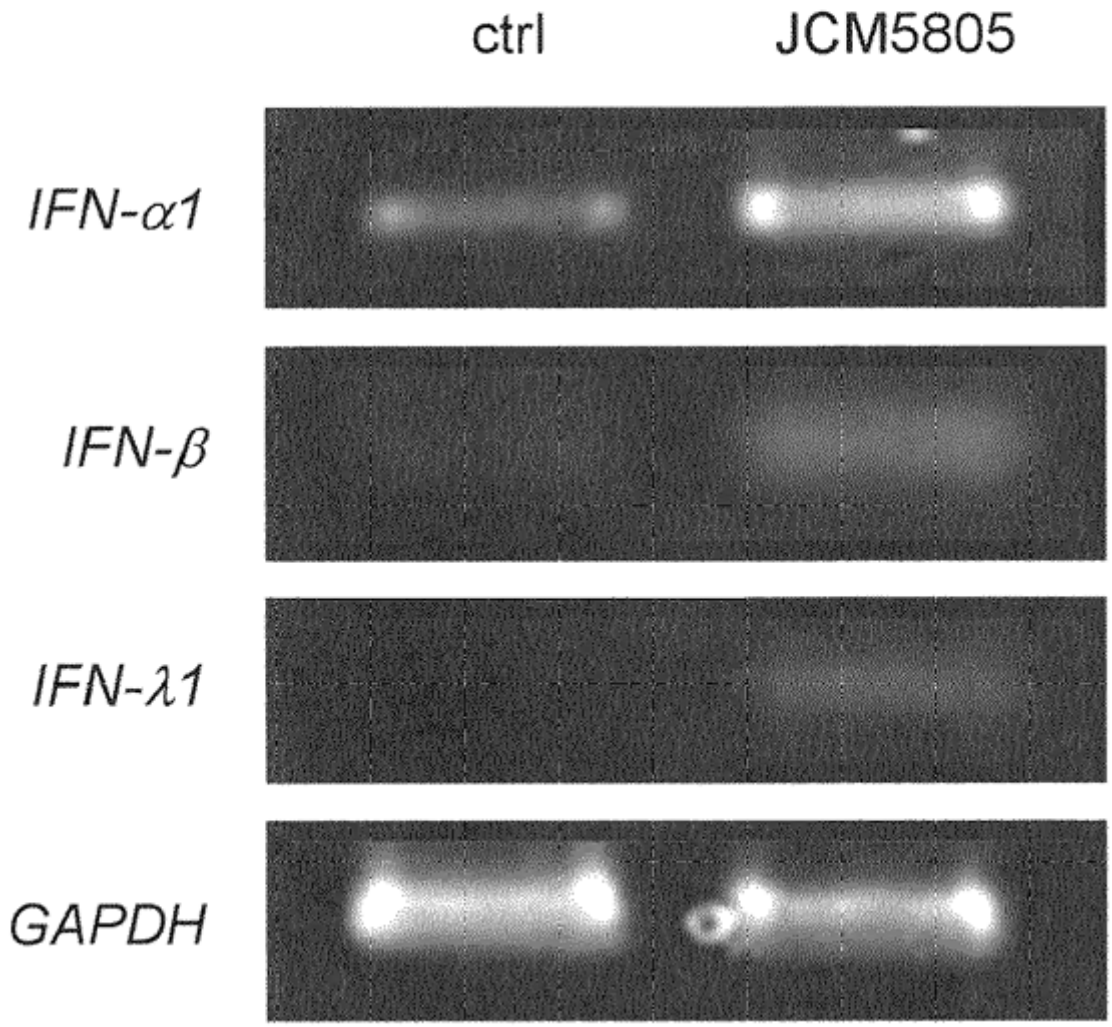


Fig. 20A

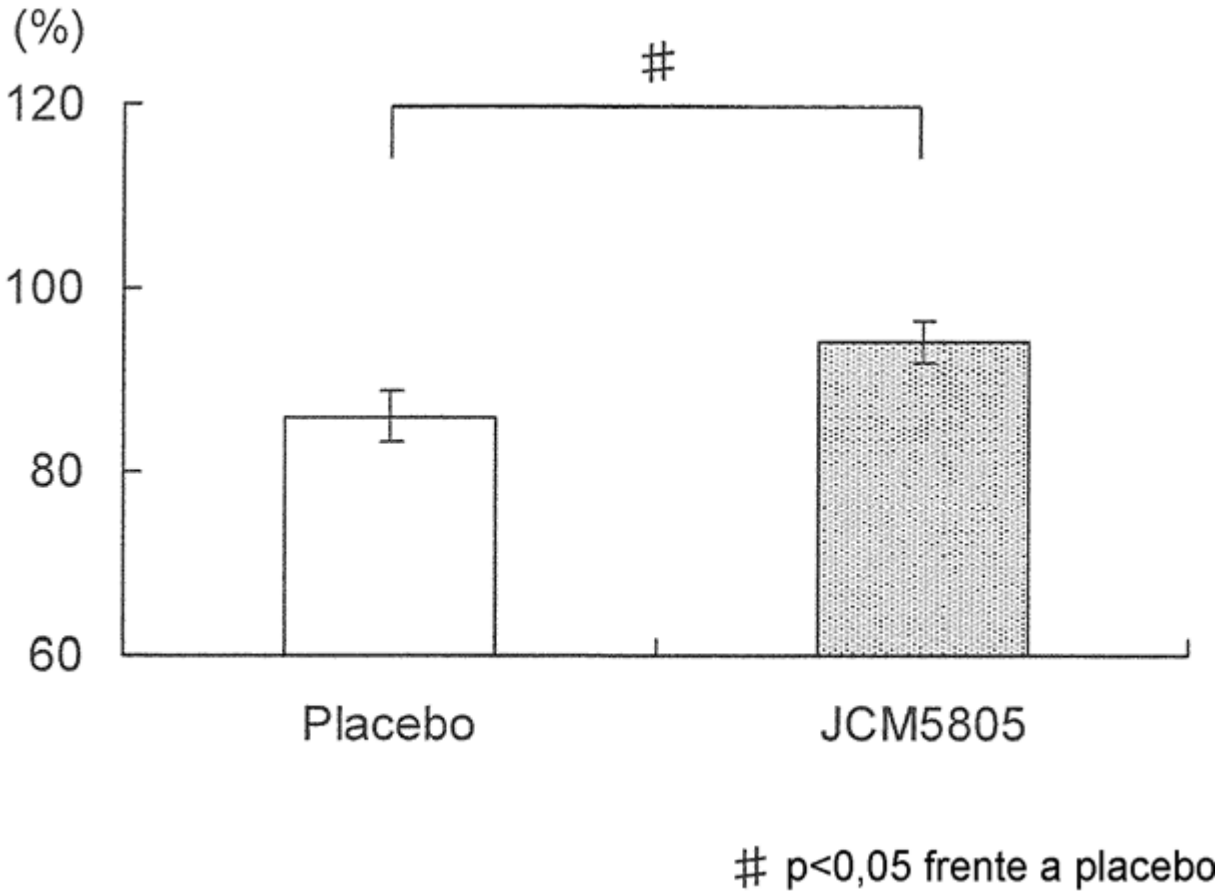


Fig. 20B

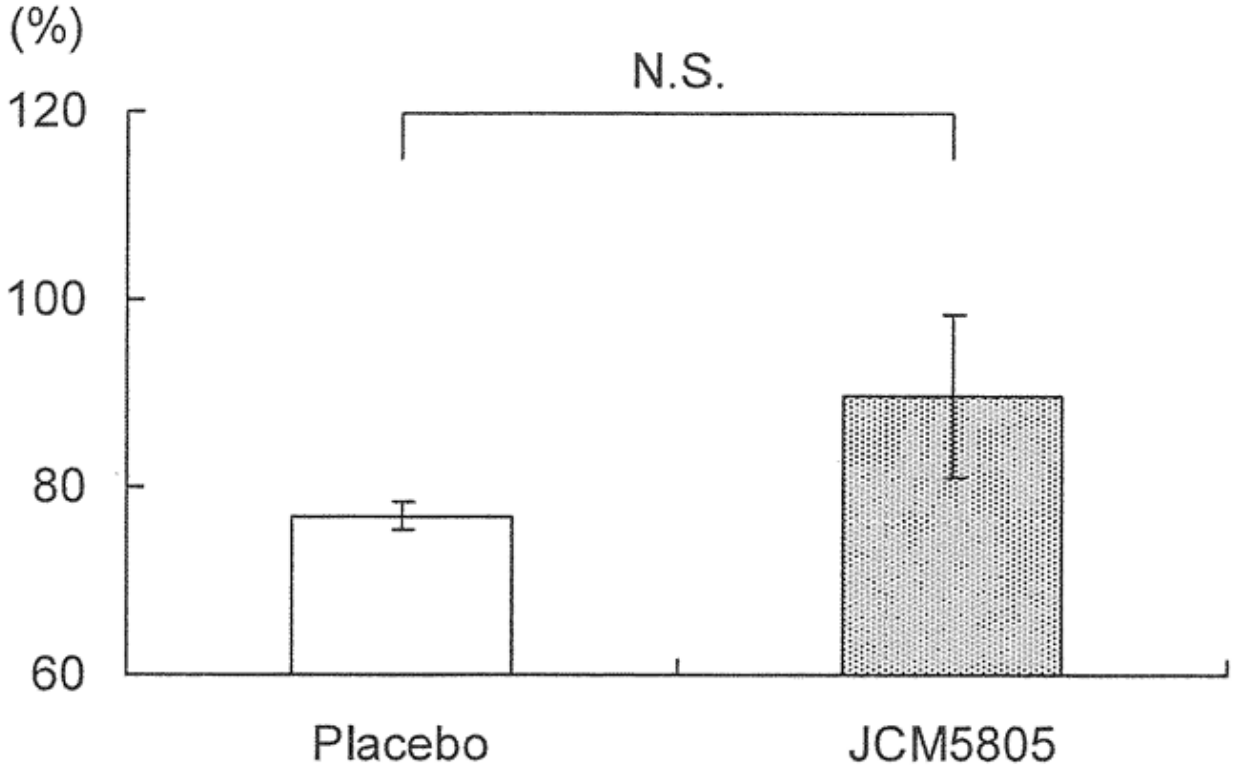
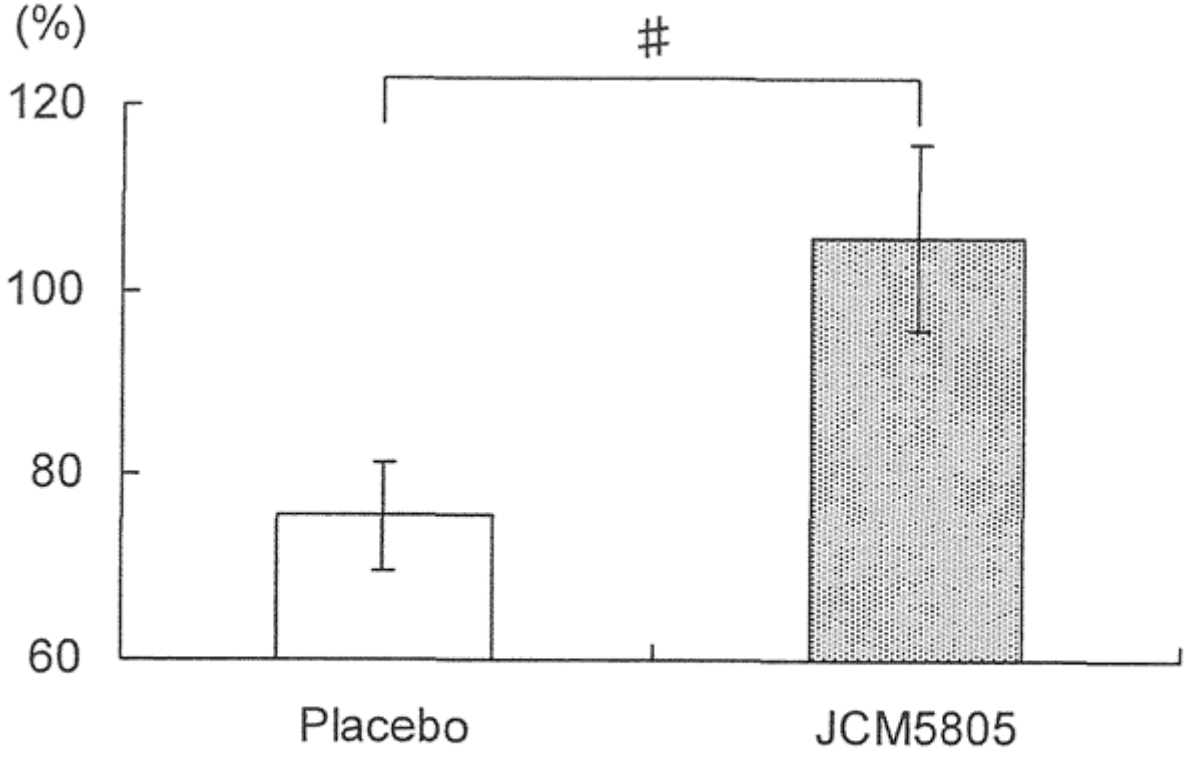
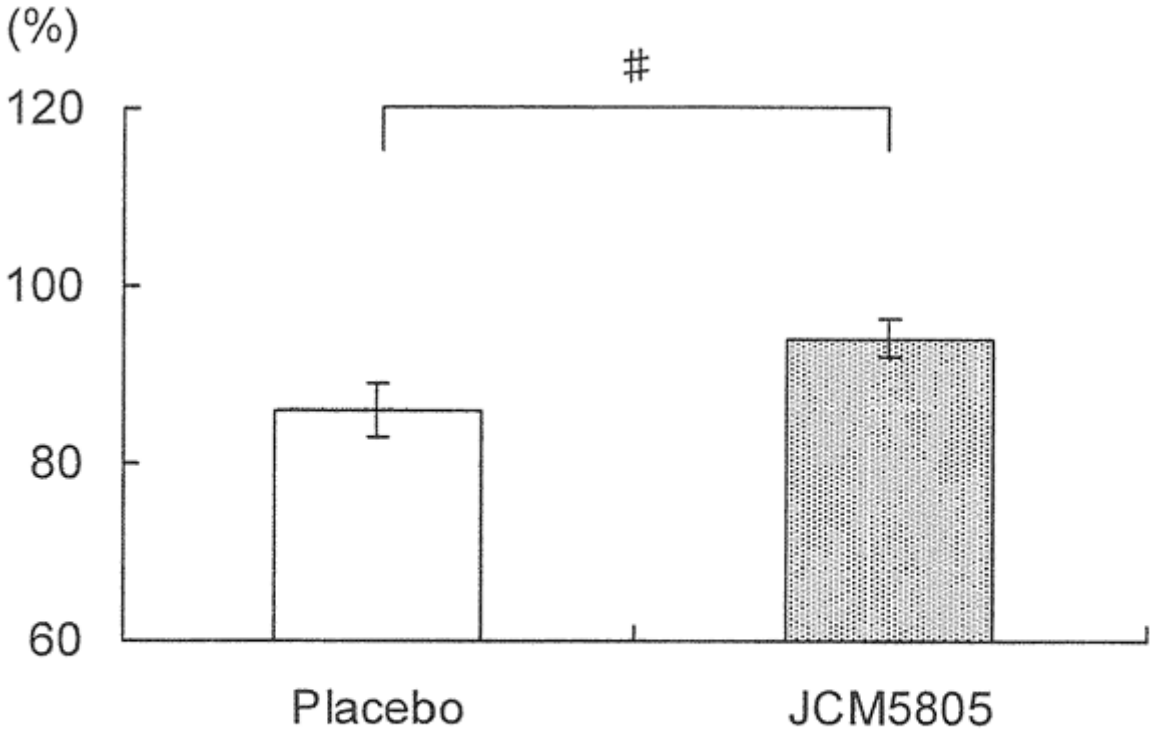


Fig. 20C



# p<0,05 frente a placebo

Fig. 20D



# p<0,05 frente a placebo

Fig. 20E

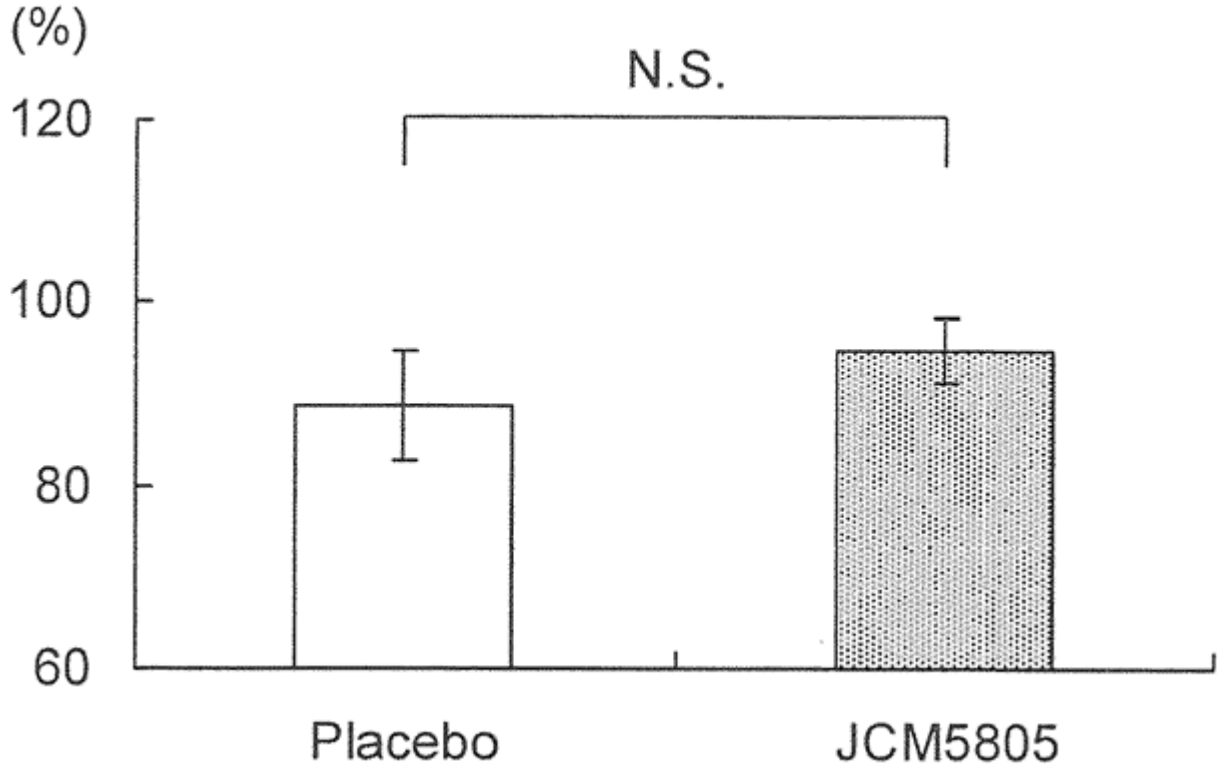


Fig. 20F

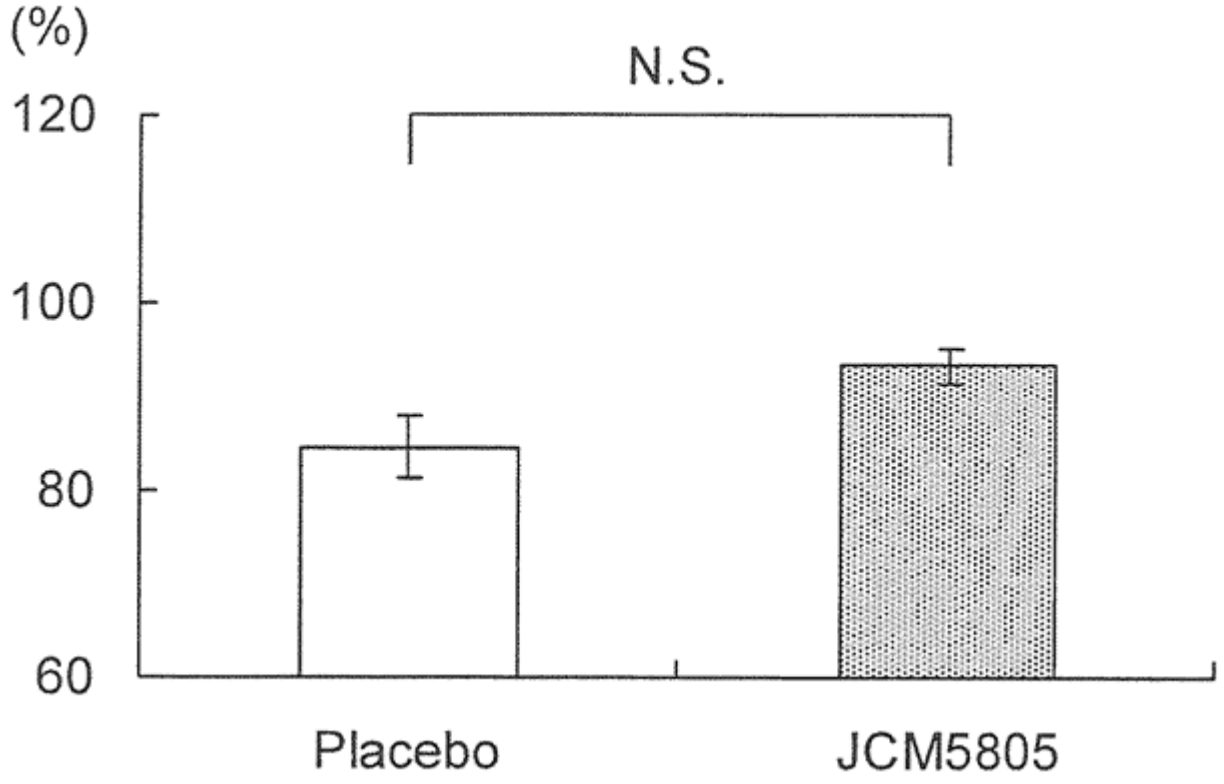
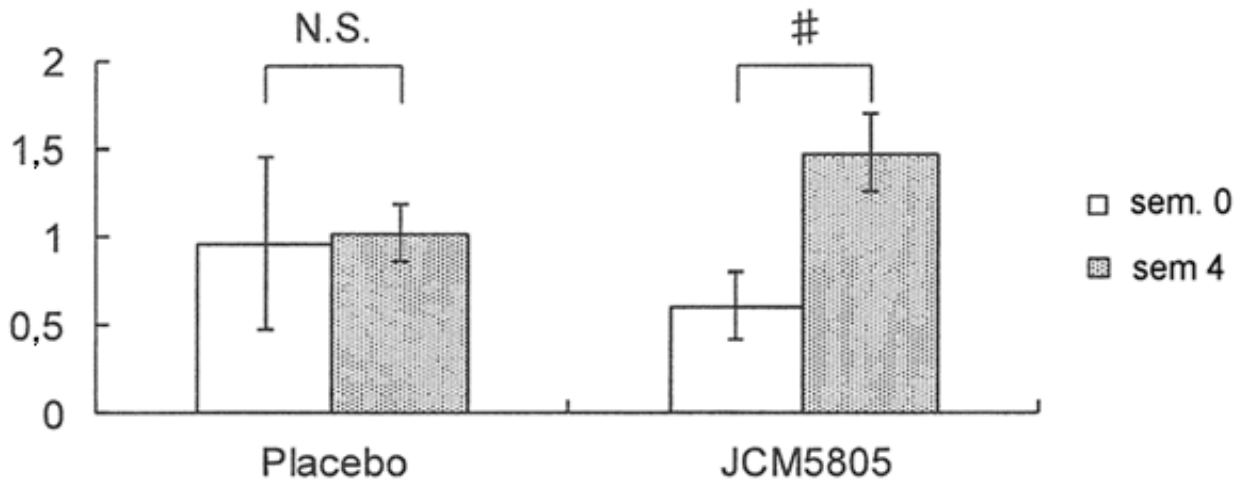
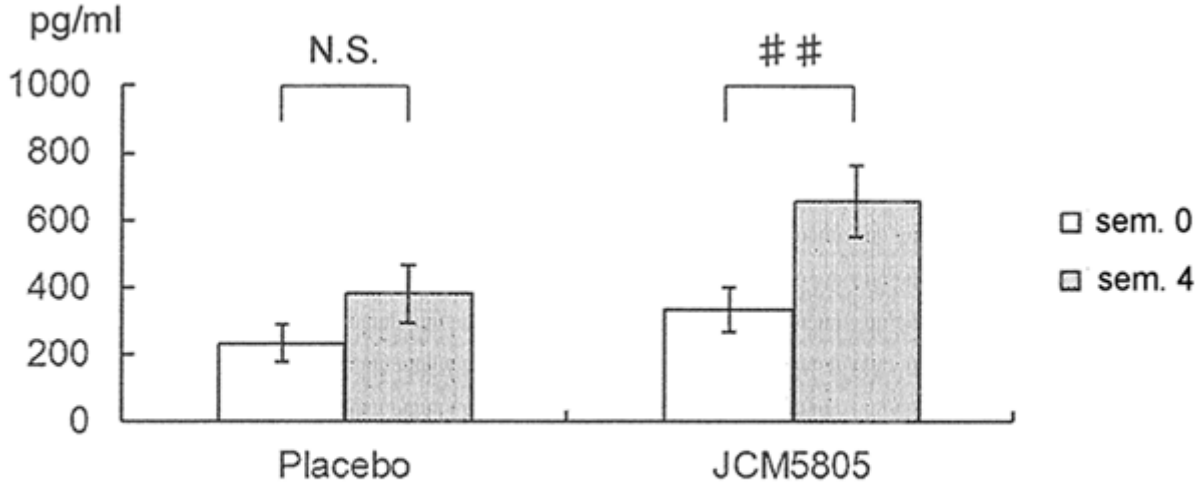


Fig. 21



# p<0,05 mediante prueba de la t apareada

Fig. 22



p<0,01 mediante prueba de la t apareada

Fig. 23

	Promedio de puntuación	1: sin síntomas	Con síntomas > 1	Prueba de x^2 cuadrado (valor de p)
Semana 1	JCM5805	90	43	0,601
	Placebo	84	46	
Semana 2	JCM5805	105	27	0,125
	Placebo	95	38	
Semana 3	JCM5805	93	38	0,220
	Placebo	85	48	
Semana 4	JCM5805	100	33	0,004
	Placebo	78	55	