

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 973**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2015 PCT/KR2015/003914**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15170839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2015 E 15788586 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3141254**

54 Título: **Lactobacillus rhamnosus RHT-3201 conjugado con aglutinante polimérico polisacárido y uso del mismo para la prevención o tratamiento de enfermedades atópicas**

30 Prioridad:

07.05.2014 KR 20140054237

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

18.06.2019

73 Titular/es:

**ILDONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
(Yangjae-dong) 2, Baumoe-ro 27- gil
Seocho-gu, Seoul 137-733, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SEUNG-HUN;
KANG, DAE-JUNG y
KANG, JAE-HOON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 716 973 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lactobacillus rhamnosus RHT-3201 conjugado con aglutinante polimérico polisacárido y uso del mismo para la prevención o tratamiento de enfermedades atópicas

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, un método de preparación de la misma y un uso de la misma y, más específicamente, a un método para preparar *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico preparada mediante el método, y una composición farmacéutica y una composición alimentaria para prevenir y tratar la dermatitis atópica que contiene la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico como principio activo.

Técnica antecedente

- 15 Dermatitis atópica (DA) se refiere a una manifestación inflamatoria de la piel crónica y recurrente que muestra prurito y se observa principalmente en bebés y niños. La atopía es la enfermedad alérgica más representativa junto con la rinitis alérgica y el asma bronquial, mientras que se sabe que la tasa de prevalencia de la atopía es del 10-30 % en niños y del 1-3 % en adultos.

- 20 La dermatitis atópica aparece debido a una reacción hipersensible del sistema inmunitario contra antígenos, tales como ácaros del polvo, que invaden el cuerpo. Los antígenos se entregan a los linfocitos T a través de macrófagos, mientras que los linfocitos T se diferencian en linfocitos Th1 o Th2 de acuerdo con el tipo de antígenos o receptores que reaccionan con los mismos. Los linfocitos Th2 activan la inmunidad humoral a través de citocinas, tales como IL-4, IL-5 y IL-10, y activan los linfocitos B, conduciendo a una producción aumentada de IgE y provocando por tanto la dermatitis atópica. Por otro lado, los linfocitos Th1 activan inmunidad celular a través de IL-12 e IFN- γ , e IFN- γ inhibe la producción de IgE. Por lo tanto, se mantiene el equilibrio de la regulación inmunitaria de linfocitos Th1 y linfocitos Th2 para aliviar los síntomas atópicos.

- 25 Aunque aún no existe ningún método de tratamiento definitivo para la dermatitis atópica, se utilizan con tal fin fármacos antialérgicos, fármacos antihistamínicos, esteroides y otros medicamentos. De estos, los esteroides, que han sido los que se han descrito con mayor frecuencia en una formulación de ungüento para tratar la dermatitis atópica, degradan la respuesta inmunitaria para reducir la inflamación, mientras que se ha informado de que provocan diversos tipos de efectos secundarios tras al usarlos a largo plazo.

- 30 Por otra parte, se están comercializando muchas bacterias del ácido láctico o productos lácticos que contienen bacterias del ácido láctico como materiales alimentarios que tienen una actividad reguladora inmunitaria. Los ejemplos de las bacterias del ácido láctico pueden incluir el género *Lactobacillus*, el género *Lactococcus*, el género *Streptococcus*, el género *Pediococcus*, el género *Enterococcus* y similares, y se sabe que estas bacterias del ácido láctico tienen una acción inmunopotenciadora o antialérgica. A los inventores de la presente invención se les concedió un derecho de patente para *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 que tiene una función inmunorreguladora equilibrada de linfocitos Th1 y Th2, que es un nuevo material de cepa que no tiene ningún efecto secundario al utilizarse durante un periodo de tiempo prolongado y es capaz de tratar fundamentalmente la dermatitis atópica (Registro de Patente Coreana N.º 100742900000).

- 40 Sin embargo, 100 trillones o más de bacterias entéricas de aproximadamente 500 tipos diferentes viven en los intestinos humanos, mientras que las bacterias dañinas, tales como *E. coli*, y las bacterias beneficiosas, tales como bacterias del ácido láctico, se mantienen de manera equilibrada como flora residente. Por lo tanto, los probióticos de ácido láctico administrados poseen una capacidad limitada en su adherencia competitiva a la mucosa intestinal, por lo que se ha variado su efecto dependiendo de su tasa de adherencia. Además, cierto número de bacterias probióticas del ácido láctico se destruyen durante su paso por el tracto gastrointestinal o se retiran de la competición de adherencia y después se descargan junto con la defecación. Por tanto, las bacterias probióticas del ácido láctico tienen una limitación en su contribución al tratamiento de una atopía grave.

- 45 Además, los probióticos deben tomarse de una manera administrativa más excesiva que sus recuentos estándar para mejorar la eficacia de su adhesión a la mucosa intestinal, al tiempo que se les exige que pasen muchos obstáculos en el cuerpo antes de su llegada a los intestinos. Por tanto, el recuento de admisión microbiana y la eficacia del tratamiento de la atopía son difíciles de predecir. Debido a estos problemas, hay pocas bacterias del ácido láctico que muestren el mismo nivel o eficacia de tratamiento que los fármacos basados en esteroides. A pesar de los esfuerzos para mejorar la eficacia de los probióticos en una formulación compuesta, ha habido problemas debido a que es imposible establecer el nivel normalizado para el efecto de los probióticos puesto que la muerte de cepas de bacterias probióticas sucede de forma natural a lo largo del tiempo durante su almacenamiento.

- 55 A medida que los estudios sobre el sistema inmunológico de la mucosa intestinal humana han avanzado recientemente, ha habido informes sobre la interacción y fuerza adhesiva entre las células inmunitarias de la mucosa intestinal de un ser humano como hospedador y los componentes de la pared celular de bacterias del ácido láctico.

De estos, el receptor-2 de tipo Toll (TLR-2) de células dendríticas(CD) se une con el ácido lipoteicoico y el peptidoglucano existentes en la pared celular de dichas bacterias para entregar las señales relacionadas con el sistema inmunitario.

5 Además, las bacterias del ácido láctico que tienen funciones inmunorreguladoras consiguen la producción extracelular de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y proteínas inmunitarias cuando se fermentan en medios específicos y distintos, promoviendo de este modo la secreción de IFN- γ e IL-12 desde los linfocitos Th1 y conduciendo de este modo al alivio de la dermatitis atópica. Sin embargo, mientras que la mayoría de los productos fermentados con bacterias del ácido láctico no alivian la dermatitis atópica, únicamente algunas bacterias selectivas del ácido láctico producen estas sustancias, y por tanto el valor de desarrollar tales bacterias es alto.

10 Con estos antecedentes, se necesita el desarrollo de una composición que sea útil para tratar la dermatitis atópica de manera más fundamental, superando los efectos secundarios de los fármacos basados en esteroides utilizados para la dermatitis atópica y la limitación de los probióticos de ácido láctico en el tratamiento de la dermatitis atópica debido a su tasa de adherencia.

15 En GODERSKA et al. Pol.J.Food Nutr.Sci. 2003, Vol 12/53, N.º 3, pp.21-24 se desvela la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* LR7 en alginato-almidón en la investigación de su supervivencia en valores del pH encontrados en secciones diferentes del tracto gastrointestinal.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

20 Los inventores de la presente invención, durante la investigación para desarrollar un material de tratamiento para la dermatitis atópica que no tenga efectos secundarios mientras se mantiene una alta eficacia a un nivel equivalente al de los fármacos basados en esteroides, han comprobado que un conjugado de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor y un aglutinante preparado mezclando un polisacárido polimérico con un filtrado de cultivo tiene una excelente capacidad adherente a las células inmunitarias de la mucosa intestinal y tiene una eficacia terapéutica para la dermatitis atópica grave sin efectos secundarios, y han completado la presente invención.

25 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un método para preparar *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, comprendiendo el método: (a) separar un medio de cultivo de fermentación preparado mediante el cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* en bacterias y un filtrado de fermentación; (b) mezclar el filtrado de fermentación de la etapa (a) y un polisacárido polimérico para preparar un aglutinante polisacárido polimérico; (c) desactivar por calor las bacterias separadas en la etapa (a); y (d) conjugar las bacterias inactivadas por calor de la etapa (c) con el aglutinante preparado en la etapa (b).

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, según se prepara mediante el método anterior.

35 Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir y tratar la dermatitis atópica, comprendiendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar un uso de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico para preparar un agente para tratar la dermatitis atópica.

40 Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar un método para prevenir o tratar la atopía, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico a un sujeto que necesita la prevención o el tratamiento de la atopía.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición alimentaria para prevenir y aliviar la dermatitis atópica, comprendiendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico.

45 Otro aspecto adicional más de la presente invención es proporcionar un uso de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico para preparar un alimento para prevenir y aliviar la dermatitis atópica.

50 Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar un método para prevenir o aliviar la atopía, comprendiendo el método alimentar a un sujeto que necesita la prevención o alivio de la atopía con un alimento que comprende, como principio activo, una cantidad eficaz de la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar *Lactobacillus*

rhamnosus inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, comprendiendo el método:

- 5 (a) separar un medio de cultivo de fermentación preparado mediante el cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* en bacterias y un filtrado de fermentación; (b) mezclar el filtrado de fermentación de la etapa (a) y un polisacárido polimérico para preparar un aglutinante polisacárido polimérico; (c) desactivar por calor las bacterias separadas en la etapa (a); y (d) conjugar las bacterias inactivadas por calor de la etapa (c) con el aglutinante preparado en la etapa (b).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, según se prepara mediante el método anterior, en el que la inactivación por calor se realiza a un intervalo de temperaturas de 60-100 °C y/o durante 10-120 minutos.

- 10 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir y tratar la dermatitis atópica, comprendiendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico.

También se desvela el uso de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico para preparar un agente para tratar la dermatitis atópica.

- 15 También se desvela un método para prevenir o tratar la atopía, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico a un sujeto que necesita la prevención o el tratamiento de la atopía.

- 20 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición alimentaria para prevenir o aliviar la dermatitis atópica, conteniendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico.

También se desvela el uso de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico para preparar un alimento para prevenir y aliviar la dermatitis atópica.

- 25 También se desvela un método para prevenir o aliviar la atopía, comprendiendo el método alimentar a un sujeto que necesita la prevención o alivio de la atopía con un alimento que comprende, como principio activo, una cantidad eficaz de la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

La presente invención proporciona un método para preparar *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, comprendiendo el método:

- 30 (a) separar un medio de cultivo de fermentación preparado cultivando *Lactobacillus rhamnosus* en bacterias y un filtrado de fermentación;
(b) mezclar el filtrado de fermentación de la etapa (a) y un polisacárido polimérico para preparar un aglutinante polisacárido polimérico;
(c) inactivar las bacterias separadas en la etapa (a); y
(d) conjugar la bacteria inactivadas por calor en la etapa (c) con el aglutinante preparado en la etapa (b).

- 35 La etapa (a) es un proceso de separar un medio de cultivo de fermentación, que es un producto cultivado de *Lactobacillus rhamnosus*, en bacterias y un filtrado de fermentación.

Las bacterias de *Lactobacillus rhamnosus* del ácido láctico de la presente invención incluyen todas las cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, y pueden ser preferiblemente KCTC 10833 BP de *Lactobacillus rhamnosus*.

- 40 La KCTC 10833 BP de *Lactobacillus rhamnosus* se llama "IDCC 3201 de *Lactobacillus rhamnosus*" en la solicitud de patente coreana previa (N.º 10-2006-0038066) del presente solicitante, y en el presente documento, los nombres pueden utilizarse de manera intercambiable uno con el otro.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "cultivar" tiene un significado que incluye fermentación. El cultivo en el presente documento puede realizarse por métodos conocidos para cultivar bacterias del ácido láctico. Los ejemplos del cultivo pueden incluir, pero sin limitación, un método en el que se inoculan bacterias en un medio de cultivo o un sustrato de cultivo y después se dejan durante un periodo de tiempo predeterminado mientras se mantiene una temperatura de crecimiento predeterminada en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

- 50 Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo" se refiere a un sustrato de cultivo sólido o líquido que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de células animales, células vegetales o microorganismos. En el presente documento, el medio de cultivo puede incluir medios para bacterias del ácido láctico. Un ejemplo del medio de cultivo puede incluir, pero sin limitación, un medio líquido de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), un medio multiuso con Tween (APT) y un medio de infusión de cerebro y corazón (BHI del inglés Brain Heart Infusion), y puede ser preferiblemente un medio líquido MRS. Los medios pueden usarse en forma de un medio modificado (por ejemplo, un medio MRS modificado) mediante el ajuste selectivo de la composición de materiales y

los contenidos de materiales que constituyen el medio de acuerdo con los deseos de un experto en la materia.

El medio de cultivo de la presente invención contiene, como sustratos del medio, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales y elementos de crecimiento necesarios para el crecimiento de bacterias del ácido láctico. Los tipos de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, minerales y elementos de crecimiento no están limitados siempre y cuando estos materiales estimulen una acción sinérgica para el crecimiento de bacterias del ácido láctico, aunque estos materiales son conocidos en los campos relevantes. Por ejemplo, pueden usarse diversos carbohidratos como fuente de carbono. La fuente de carbono puede ser preferiblemente glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa, lactosa, xilosa, galactosa o arabinosa. Además, pueden usarse diversas fuentes de nitrógeno orgánico como fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser preferiblemente extracto de levadura, Soytone, peptona, un extracto de carne, triptona o casitona. El tipo de fuente de mineral no está limitado siempre y cuando la fuente de mineral sea conocida en la técnica para el crecimiento de bacterias del ácido láctico. Los ejemplos de las fuentes de mineral pueden incluir sulfato de magnesio ($MgSO_4$), sulfato de manganeso ($MnSO_4$), hidrogenofosfato dipotásico (K_2HPO_4), cloruro de amonio (NH_4Cl), carbonato cálcico ($CaCO_3$) y acetato sódico (CH_3COONa). Además, pueden añadirse diversos polvos o extractos de material alimentario de partida al medio de cultivo de acuerdo con la necesidad de un experto en la materia, aunque los ejemplos de los mismos pueden incluir un polvo o extracto de maíz, un polvo o extracto lactosérico, un polvo o extracto de leche desnatada, un polvo o extracto de té verde o un polvo o extracto de champiñón, pero no se limitan a los mismos.

En el proceso de cultivo, la temperatura puede cambiarse por un experto en la materia dependiendo del tipo de bacterias del ácido láctico. Por ejemplo, la temperatura puede ser 30-45 °C, pero no se limita a la misma. La temperatura puede ser preferiblemente 33-40 °C, y lo más preferiblemente 35-39 °C.

En el proceso de cultivo, el tiempo de cultivo puede cambiarse por un experto en la materia dependiendo de una eficacia de trabajo deseada. Por ejemplo, este puede ser de 12-96 horas, pero no se limita al mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo de fermentación" se refiere al obtenido inoculando y fermentando (o cultivando) una cepa en un medio líquido, mientras que la expresión "filtrado de fermentación" se refiere a un filtrado de cultivo obtenido retirando la cepa del líquido de cultivo fermentado.

La separación de las bacterias y el filtrado de fermentación puede realizarse por métodos de separación de bacterias conocidos (por ejemplo, centrifugación o ultrafiltración), pero no se limita a los mismos.

La etapa (b) es un proceso de mezclar el filtrado de fermentación separado en la etapa (a) con un material polisacárido polimérico para preparar un aglutinante polisacárido polimérico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "aglutinante polisacáridos polimérico" se refiere a una mezcla de un filtrado de fermentación un un material polisacárido polimérico, o un concentrado de la mezcla. Dependiendo de la composición y el procedimiento de preparación del aglutinante, puede regularse la capacidad adherente a la mucosa intestinal y la capacidad para producir diversas citocinas en células inmunitarias.

El tipo de material polisacárido polimérico en la etapa (b) no está limitado siempre y cuando el material polisacárido polimérico sea conocido en la técnica. Los ejemplos del material polisacárido polimérico pueden incluir ácido hialurónico, alginato, maltodextrina, quitosano, carragenano, galactomanano, glucomanano, dextrano, fucoidan, agar, porfirano, quitina, y similares. El polisacárido polimérico de la presente invención puede ser preferiblemente ácido hialurónico, alginato, maltodextrina o quitosano.

El porcentaje del material polisacárido polimérico añadido puede cambiarse selectivamente dependiendo de la viscosidad o fuerza adherente deseadas por la persona experta en la materia. Por ejemplo, el material polisacárido polimérico puede añadirse al filtrado de fermentación a una proporción de 0,0001-10 %(p/v), pero no se limita a la misma.

En el presente documento, una realización preferible de la etapa (b) puede incluir la adición de ácido hialurónico como material polisacárido polimérico en el filtrado de fermentación a una proporción de 0,0001-10 %(p/v), y lo más preferiblemente la adición de ácido hialurónico al filtrado de fermentación a una proporción de 0,0001-0,01 %(p/v).

El ácido hialurónico es uno de los polisacáridos complejos compuestos de aminoácidos y ácidos urónicos, y es un compuesto polimérico compuesto de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico. El peso molecular del ácido hialurónico de la presente invención no está limitado. Por ejemplo, el ácido hialurónico incluye ácidos hialurónicos que tienen un peso molecular de 1.000.000, 2.000.000, 3.000.000, 4.000.000 y 4.500.000, preferiblemente ácido hialurónico que tiene un peso molecular de 1.000.000 o 2.000.000, y lo más preferiblemente ácido hialurónico que tiene un peso molecular de 1.000.000.

La etapa (b) puede incluir además un proceso de concentración para obtener un aglutinante polisacárido polimérico altamente concentrado.

Como se usa en el presente documento, la concentración puede realizarse mediante dispositivos o métodos de concentración conocidos en la técnica. Los ejemplos de la concentración pueden incluir, sin limitación, concentración

por precipitación, concentración por evaporación, concentración a presión reducida, ultra-filtración, ósmosis inversa y centrifugación, preferiblemente concentración a presión reducida.

La etapa (c) es un proceso de inactivación por calor de las bacterias separadas en la etapa (a).

5 La expresión "inactivación por calor" se refiere a la inactivación de bacterias probióticas a través un tratamiento térmico durante un periodo de tiempo predeterminado, aunque la inactivación por calor afecta a la composición de los principios activos contenidos en la bacteria, la estructura de la bacteria y la capacidad adherente a los intestinos dependiendo de las condiciones de inactivación por calor. El propósito más importante de inactivar por calor las bacterias probióticas es formar una estructura que se adhiera de un modo favorable a las células inmunitarias de la mucosa intestinal mediante inducción de ácido lipoteicoico y peptidoglucano, que son ingredientes representativos
10 contenidos en la estructura celular de *Lactobacillus rhamnosus*. Es decir, el ácido lipoteicoico y el peptidoglucano que forman la estructura celular se combinan con TRL-2 de células dendríticas de la mucosa intestinal para promover la producción de citocinas relacionadas con el sistema inmunitario y por tanto es importante que la estructura se prepare de tal forma para que tenga la eficacia de adherencia más favorable.

15 La temperatura para la inactivación por calor en la presente invención no está limitada siempre y cuando esté dentro de un intervalo de temperatura en el que los ingredientes funcionales de la bacteria no se desnaturalicen. La temperatura puede ser, por ejemplo, 60-100 °C, preferiblemente 70-90 °C y lo más preferiblemente 75-85 °C.

El tiempo para la inactivación por calor no está limitado siempre y cuando esté en un intervalo de tiempo en el que los ingredientes funcionales de la bacteria no se desnaturalicen. El tiempo puede ser, por ejemplo, 10-120 minutos, preferiblemente 30-90 minutos y lo más preferiblemente 50-70 minutos.

20 Después del proceso de inactivación por calor, puede añadirse opcionalmente un proceso de refrigeración de acuerdo con las necesidades una persona experta en la materia. El proceso de refrigeración puede realizarse por métodos de refrigeración conocidos y la temperatura de refrigeración puede cambiarse selectivamente de acuerdo con el deseo de una persona experta en la materia. El proceso de refrigeración puede realizarse a un intervalo de temperatura de, por ejemplo, 10-40 °C y preferiblemente 25-35 °C.

25 La etapa (d) es un proceso de conjugar la bacteria inactivada por calor en la etapa (c) con el aglutinante preparado en la etapa (b).

30 El término "conjugar" se refiere a formar una sola unidad mediante acoplamiento de dos o más materiales. En la etapa (d), el aglutinante y la bacteria inactivada por calor se conjugan mediante una serie de reacciones inducidas mediante infiltración de la bacteria inactivada por calor de la etapa (c) en el aglutinante preparado en la etapa (b) o mezclando la bacteria inactivada por calor y el aglutinante.

El método de preparación que comprende las etapas (a) a (d) opcionalmente puede incluir adicionalmente un proceso de adición de excipiente, un proceso de secado y un proceso de pulverización para facilitar el manejo, almacenamiento y similares en el momento de preparar la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, de acuerdo con la necesidad de una persona experta en la materia.

35 El tipo de excipiente no está limitado siempre y cuando este sea conocido en la técnica. Los ejemplos del excipiente pueden incluir almidón.

El proceso de secado puede realizarse por métodos de secado conocidos. Los ejemplos del proceso de secado pueden incluir criodesecado, secado por pulverización y secado por aire caliente, pero no se limitan a los mismos.

40 La presente invención proporciona la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico preparado por el método anterior.

45 La *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que se prepara por el método que comprende las etapas (a) a (d). La *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico se nombra "RHT-3201" por los inventores de la presente invención, y en el presente documento, los términos pueden usarse de forma intercambiable entre sí.

50 Se demuestra que la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención posee un excelente efecto terapéutico de tratamiento de una enfermedad atópica, junto con una competitividad de adherencia significativamente mejorada a la mucosa intestinal en comparación con las preparaciones de bacterias del ácido láctico existentes (véase Ejemplo 6) y los efectos de prevenir, aliviar o tratar la dermatitis atópica a un nivel equivalente a los fármacos basados en esteroides existentes (por ejemplo, dexametasona) (véanse los Ejemplos 9 y 10).

Además, con respecto a la estabilidad en el entorno del tracto gastrointestinal, que es problemática tras el consumo oral de probióticos de ácido láctico, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención mantienen sus funcionalidades (efectividad) a un nivel

mayor que los probióticos de ácido láctico convencionales. Más particularmente, a pesar de la exposición a fluido gástrico artificial (ácidos gástricos) y fluido intestinal artificial (ácidos biliares), la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención mantiene su eficacia de adherencia a la mucosa intestinal a un alto nivel (véase Ejemplo 7), mientras que también puede confirmarse su estabilidad al almacenamiento a diversas temperaturas (véase Ejemplo 8).

Como se usa en el presente documento, "atopía" se refiere a una serie de síntomas alérgicos que se manifiestan en la piel, la mucosa respiratoria, la mucosa ocular, la mucosa intestinal o similares, en un individuo que tiene tendencia atópica, y dicha tendencia atópica (predisposición) se transmite de generación en generación para mostrar características familiares. Las enfermedades alérgicas provocadas por tendencia atópica pueden incluir dermatitis alérgica, rinitis alérgica, asma, conjuntivitis alérgica, urticaria atópica y similares, y estas enfermedades pueden aparecer solas o pueden aparecer varias enfermedades al mismo tiempo. La dermatitis atópica, que es una de las enfermedades de la piel representativas que se observan en personas que tienen alergias atópicas, es una enfermedad crónica de la piel llamada, habitualmente, fiebre congénita. La dermatitis atópica tiene como síntomas principales la piel seca y el prurito, mientras que en algunos casos está acompañada de otras enfermedades alérgicas (tales como urticaria, alergias a metales, asma y rinitis alérgica) por sus características inmunológicas y tendencia familiar.

Como se usa en el presente documento, "dermatitis atópica (DA)" es una afección inflamatoria cutánea crónica y recurrente con prurito, y muestra una reacción hipersensible del sistema inmunitario contra antígenos, tales como ácaros del polvo, que invaden el cuerpo. Los antígenos que invaden el cuerpo se entregan a los linfocitos T a través de macrófagos, mientras que los linfocitos T se diferencian en linfocitos Th1 o Th2 dependiendo del tipo de antígenos o receptores que reaccionan con ellos. Después, los linfocitos Th2 activan la inmunidad humoral a través de citocinas, tales como IL-4, IL-5 e IL-10, y activan los linfocitos B, conduciendo a una producción aumentada de IgE y provocando después dermatitis atópica. Es decir, en cuanto a la anomalía inmunitaria en dermatitis atópica, mientras que la inmunoglobulina IgE se adhiere a las superficies de los mastocitos alrededor de los vasos sanguíneos en el cuerpo o en la piel, los antígenos invaden de nuevo el cuerpo humano para unirse con inmunoglobulinas para activar los mastocitos, permitiendo de este modo de los mastocitos secreten sustancias químicas, tales como histamina. Estas sustancias químicas estimulan los vasos sanguíneos y la piel, causando manchas rojas, edema y prurito en la piel, de este modo causando o agravando la dermatitis atópica.

Por el contrario, los linfocitos Th1 activan la inmunidad celular a través de IL-12 e IFN- γ , mientras que el IFN- γ inhibe la producción de IgE.

Por lo tanto, considerando que la regulación inmunitaria equilibrada de linfocitos Th1 y linfocitos Th2 es una clase esencial en la prevención o tratamiento de síntomas atópicos, se encuentra que la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención es excelente en la regulación inmunitaria equilibrada de linfocitos Th1 y Th2, consiguiendo especialmente una regulación inmunitaria equilibrada entre citocinas de tipo Th1 y citocinas de tipo Th2 a través de diferentes mecanismos inmunorreguladores de acuerdo con la gravedad de la dermatitis atópica (véanse Ejemplos 9 y 10). Es decir, en el caso de dermatitis atópica leve, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención regula y mantiene el equilibrio inmunológico de linfocitos Th1 y Th2, mientras que en el caso de dermatitis atópica grave, inhibe las actividades de los linfocitos Th1 y Th2 a través de la estimulación de linfocitos T reguladores, tratando y aliviando de este modo la dermatitis atópica grave.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir y tratar la dermatitis atópica, comprendiendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico. Además, la presente invención proporciona: un uso de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico para preparar un agente para tratar la dermatitis atópica; y un método para tratar o prevenir la atopía, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico a un sujeto que necesita tratamiento o prevención de atopía.

La dermatitis atópica según se describe en la presente invención se clasifica en los tipos leve, moderado y grave dependiendo del progreso de los síntomas de la enfermedad. La dermatitis atópica en la presente invención puede ser preferiblemente dermatitis atópica grave.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" puede ser un animal, preferiblemente un mamífero, y en particular, un animal que incluye un ser humano.

Ha habido muchos informes con respecto a las escalas para evaluar la evolución clínica y la eficacia terapéutica de la dermatitis atópica. Como la escala representativa, se conocen el índice de gravedad y área del eccema (EASI), valoración de dermatitis atópica (SCORAD), medición de eccema orientada al paciente (POEM) y gravedad de tres elementos (TIS). Preferiblemente, la gravedad de la dermatitis atópica en la presente invención se clasifica de acuerdo con la valoración de dermatitis atópica (SCORAD del inglés SCORing Atopic Dermatitis).

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener únicamente una cantidad terapéuticamente eficaz de la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico o puede contener adicionalmente al menos un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a un paciente en una sola dosis, o puede administrarse en múltiples dosis mediante un protocolo de tratamiento fraccionado durante un largo periodo de tiempo. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente aceptable" se refiere a una cantidad requerida para mostrar una respuesta mayor en comparación con un control negativo, y preferiblemente una cantidad suficiente para tratar o prevenir la dermatitis atópica. La cantidad eficaz de la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención puede ser 0,001-1000 mg/kg p.c./día y preferiblemente 0,055-16,65 mg/kg p.c./día, pero no se limita a la misma. Sin embargo, la cantidad farmacéuticamente aceptable puede variarse adecuadamente dependiendo de diversos factores, tales como el tipo de enfermedad y la gravedad de la misma, edad, peso corporal, condición física y género de un paciente, la ruta de administración y el periodo de tratamiento.

La composición de la presente invención puede formularse de diversas formas junto con el portador farmacéuticamente aceptable, dependiendo de una ruta de administración, por métodos conocidos en la técnica. Como se usa en el presente documento, la expresión composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición no tóxica que es fisiológicamente aceptable, no inhibe la acción de un principio activo cuando se administra a seres humanos y no induce habitualmente una reacción alérgica o reacciones similares, tales como problemas gastrointestinales y mareos. La composición de la presente invención puede formularse de diversas formas junto con el portador farmacéuticamente aceptable, dependiendo de una ruta de administración, por un método conocido en la técnica. La ruta de administración puede ser, pero sin limitación, administración oral o parenteral, y preferiblemente administración oral.

La composición farmacéutica de la presente invención, cuando se administra por vía oral, puede formularse, junto con un portador adecuado para administración oral, en forma de un polvo, gránulos, a un comprimido, una píldora, un comprimido recubierto con azúcar, una cápsula, un líquido, un gel, un jarabe, una suspensión, una oblea o similares por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el comprimido o comprimido recubierto con azúcar para una preparación oral puede obtenerse mezclando un principio activo con un excipiente sólido, pulverizando la mezcla, añadiendo un adyuvante adecuado al mismo y después procesando la mezcla en una mezcla de gránulos. Los ejemplos del excipiente adecuado pueden incluir: azúcares incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; almidones incluyendo almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; celulosas incluyendo celulosa, metil celulosa, carboxi metil celulosa sódica e hidroxipropil metil celulosa; y una carga, tal como gelatina o polivinil pirrolidona. En algunos casos, puede añadirse como disgregante polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o alginato sódico. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener adicionalmente un anticoagulante, un agente lubricante, un agente humectante, un agente saborizante, un emulsionante y un conservante.

Además, cuando se administra por vía parenteral, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, junto con un portador adecuado para administración parenteral, puede formularse por métodos conocidos en la técnica. Para otros portadores farmacéuticamente aceptables, puede hacerse referencia a los desvelados en la siguiente bibliografía (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA).

Además, adicionalmente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse junto con compuestos que se sabe que son eficaces en la prevención y tratamiento de enfermedades atópicas o dermatitis atópica.

Además, la presente invención proporciona una composición alimentaria para prevenir y aliviar la dermatitis atópica, comprendiendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico. Además, la presente invención proporciona: un uso de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico para preparar un alimento para prevenir y aliviar dermatitis atópica; y un método para prevenir o aliviar atopía alimentando a un sujeto que necesita la prevención o alivio de atopía con un alimento que comprende, como principio activo, *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" puede ser un animal, preferiblemente un mamífero, y en particular, un animal que incluye un ser humano.

La composición alimentaria de la presente invención incluye todos los tipos, incluyendo alimentos funcionales, complementos nutricionales, alimentos saludables, aditivos alimentarios, bebida de yogur y leche fermentada. Los tipos anteriores de composiciones alimentarias pueden prepararse de diversas formas por métodos generales conocidos en la técnica. Preferiblemente, el alimento de la presente invención puede ser leche fermentada, yogur, una bebida, una bebida de leche, aditivos alimentarios y alimentos funcionales saludables.

Por ejemplo, para el alimento saludable, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención puede prepararse, para beber, en forma de una bebida de yogur, leche fermentada, té, zumo y bebida, o puede granularse, encapsularse o pulverizarse para el

consumo. Además, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención puede mezclarse con un material conocido o un principio activo, que se sabe que es eficaz en el alivio de enfermedades atópicas (específicamente, dermatitis atópica), para prepararse en forma de una composición.

- 5 También, para el alimento funcional, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención puede añadirse a bebidas (incluyendo bebidas alcohólicas), frutas y productos procesados de las mismas (por ejemplo, fruta enlatada, fruta embotellada, compota, mermelada), pescado, carne y productos procesados de los mismos (por ejemplo, jamón, salchicha, cecina), confitería y fideos (por ejemplo, udon, fideos de alforfón, ramen, espaguetis, macarrones), zumo de frutas, bebidas, galletas, chicles, productos lácteos (por ejemplo, mantequilla, queso), aceites vegetales, margarina, proteínas vegetales, alimentos de retortas, alimentos congelados, diversos condimentos (por ejemplo, pasta de soja, salsa de soja, sirope) o similares.

10 En la composición alimentaria de la presente invención, el contenido de la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico es preferiblemente, 0,001-50 % en peso del alimento finalmente preparado, pero no se limita al mismo.

15 Además, para usar la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico en forma de un aditivo alimentario, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención puede prepararse en forma de un polvo o un líquido concentrado.

- 20 En las composiciones farmacéuticas y alimentarias de acuerdo con la presente invención, la cantidad del principio activo mezclado puede determinarse adecuadamente para el propósito de su uso (prevención, curación o alivio sintomático) y, por ejemplo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico puede estar contenida a una concentración de 10^8 - 10^{10} UFC/g. La dosis eficaz de la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención puede determinarse de acuerdo con el intervalo de concentración anterior, pero puede ser inferior al intervalo descrito anteriormente para el propósito de salud e higiene o para un consumo a largo plazo para el control de la salud. El principio activo no tiene ningún problema de seguridad y por tanto puede usarse en una cantidad excesiva superior al intervalo descrito anteriormente.

Efectos ventajosos

- 30 La *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención es excelente en el tratamiento de una enfermedad atópica, mejora significativamente la competitividad adherente a la a la mucosa intestinal en comparación con la preparaciones de bacterias del ácido láctico existentes y muestra un efecto de prevención, alivio o tratamiento de la dermatitis atópica a un nivel equivalente a los fármacos basados en esteroides existentes. Además, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de acuerdo con la presente invención es excelente en la regulación inmunitaria equilibrada de linfocitos Th1 y Th2, y consigue especialmente una regulación inmunitaria equilibrada entre citocinas de tipo Th1 y citocinas de tipo Th2 a través de diferentes mecanismos inmunorreguladores de acuerdo con la gravedad de la dermatitis atópica.

Breve descripción de los dibujos

- 40 La FIG. 1 es una imagen de microscopía electrónica que muestra una estructura de ácido hialurónico.
La FIG. 2 es una imagen de microscopía electrónica que muestra una estructura de aglutinante concentrado.
La FIG. 3 es una imagen de microscopía electrónica que muestra una estructura de *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 antes de inactivarse por calor.
45 La FIG. 4 es una imagen de microscopía electrónica que muestra una estructura de *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 después de inactivarse por calor.
La FIG. 5 es una imagen de microscopía electrónica que muestra una estructura de RHT-3201.
La FIG. 6 ilustra las puntuaciones de evaluación del índice SCORAD del efecto terapéutico de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.
La FIG. 7 ilustra los resultados de la observación microscópica del efecto del tratamiento de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.
50 La FIG. 8 ilustra el cambio en el comportamiento de rascado de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención.
La FIG. 9 ilustra el cambio en el peso corporal de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención.
55 La FIG. 10 ilustra el cambio en el nivel de IgE en sangre de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención.
La FIG. 11 ilustra los resultados de observación macroscópica del cambio en los ganglios linfáticos de ratones de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.
La FIG. 12 ilustra el cambio de tamaño de de ganglios linfáticos de ratones de acuerdo con la administración de

RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 13 ilustra el cambio de peso de ganglios linfáticos de ratones de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

5 La FIG. 14 ilustra el cambio en producción de IFN- γ de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 15 ilustra el cambio en la producción de IL-12 de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 16 ilustra el cambio en la producción de IL-4 de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

10 La FIG. 17 ilustra el cambio en la producción de IL-10 de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 18 ilustra la proporción de IL-4/IFN- γ de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

15 La FIG. 19 ilustra la proporción de IFN- γ /IL-10 de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 20 ilustra la proporción de IL-4/IL-10 de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 21 ilustra la proporción de IL-12/IL-10 de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

20 La FIG. 22 ilustra los resultados de observación macroscópica de características patológicas del tejido cutáneo dorsal de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención (parte superior) y los resultados de observación microscópica óptica del tejido cutáneo teñido con tinción H&E (parte inferior) en modelos de dermatitis atópica grave.

25 La FIG. 23 ilustra el espesor de la epidermis de tejido cutáneo dorsal de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 24 ilustra el espesor de la dermis de tejido cutáneo dorsal de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

La FIG. 25 ilustra los resultados de la observación del estado de infiltración de mastocitos en el tejido cutáneo dorsal a través de tinción con azul de toluidina de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

30 La FIG. 26 ilustra el cambio en el número de mastocitos en el tejido cutáneo dorsal de acuerdo con la administración de RHT-3201 de la presente invención en modelos de dermatitis atópica grave.

Modo para realizar la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

35 Sin embargo, los siguientes ejemplos son meramente para ilustrar la presente invención y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

<Ejemplo 1>

Evaluación de los efectos de los aglutinantes por tipo

<1-1> Preparación de diversos tipos de muestras de aglutinante

40 Se cultivaron *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 (KCTC 10833BP) en medio MRS que contenía 0,1-1 % de polvo lactosérico a 37 °C durante 24 horas. Después del cultivo, se separaron las bacterias y el filtrado de cultivo mediante centrifugación. Después, se añadieron ácido hialurónico, alginato, maltodextrina, quitosano y polietilenglicol al 0,1 % (p/v) al filtrado de cultivo, respectivamente, seguido de agitación durante 1 hora y después y después se concentraron, preparando de este modo aglutinantes que después se criodesecaron. Cada muestra se diluyó con una solución de tampón fosfato para preparar 1 μ g/ml final de muestra. Se utilizó leche desnatada en polvo como control.

<1-2> Preparación de células esplénicas

50 Se estimularon ratones BALB/c hembra de 5 semanas de edad con 2 mg de hidróxido de aluminio y 1 mg de ovoalbúmina a través de inyección intraperitoneal y se estimularon por segunda vez de la misma manera después de seis días. Al día 13, se extirpó el bazo de cada ratón y se extrajeron células esplénicas, preparando de este modo líquido de célula esplénica. Preferiblemente, las células esplénicas se prepararon por el siguiente método.

55 El bazo de los ratones se extirpó asépticamente y se añadieron gota a gota 10 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Este se rompió utilizando unas pequeñas pinzas sobre una red de malla 60 para recoger una suspensión celular y después se dejó que se solaparan 2,5 ml de suero fetal bovino, seguido de reposo durante 10 minutos, precipitándose de este modo grandes masas. Las grandes masas se suspendieron en una solución de NH₄Cl (pH 7,0) durante 3-4 minutos para conseguir la hemólisis de glóbulos rojos. Después, la suspensión se mezcló con 2,5 ml de suero fetal bovino, seguido de centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. El precipitado se lavó dos veces con HBSS y después se dispuso en un medio DMEM que contenía suero fetal bovino al 10 % y 1

mg/ml de ovoalbúmina a 5×10^6 células/ml, preparando de este modo células esplénicas.

<1-3> Cultivo de células esplénicas y medición de citocinas

5 Se añadieron 200 μl de suspensión de células esplénicas (5×10^6 células/ml) y 10 μl (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada líquido de muestra preparado en <1-1> a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, seguido de cultivo en una incubadora de CO_2 al 5 % durante 7 días. Después de la finalización del cultivo, se midieron los niveles de IL-4 y IL-12 en el líquido de cultivo utilizando un kit Cytoset (Biosource). Los niveles de producción de IL-4 e IL-12 para cada muestra se expresaron como una proporción de aumento en comparación con el control como se muestra en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Determinación de aglutinantes			
Tipo de aglutinante	Aumento (%) comparado con control		proporción de IL-4/IL-12
	IL-4	IL-12	
Ácido hialurónico	5	52	0,09
Alginato	15	29	0,51
Maltodextrina	9	36	0,25
Quitosano	17	38	0,44
Polietilenglicol	13	22	0,59

10 Como resultados del ensayo, el aglutinante de ácido hialurónico mostró un aumento del 5 % en la producción de IL-4 y un aumento del 52 % en la producción de IL-12. El aglutinante de alginato mostró un aumento del 15 % en la producción de IL-4 y un aumento del 29 % en la producción de IL-12. El aglutinante de maltodextrina mostró un aumento del 9 % en la producción de IL-4 y un aumento del 36 % en la producción de IL-12. El aglutinante de quitosano mostró un aumento del 17 % en la producción de IL-4 y un aumento del 38 % en la producción de IL-12. El aglutinante de polietilenglicol mostró un aumento del 13 % en la producción de IL-4 y un aumento del 22 % en la producción de IL-12. Por lo tanto, cuando el aglutinante se preparó usando un polisacárido polimérico, la tasa de aumento de IL-12 fue relativamente alta, mientras que la tasa de aumento de IL-4 fue relativamente baja. De estos, el ácido hialurónico mostró la mayor tasa de aumento de IL-12 y una tasa de aumento relativamente baja de IL-4. Tras el ácido hialurónico, la maltodextrina, el quitosano y el alginato mostraron resultados favorables en ese orden.

20 **<Ejemplo 2>**

Evaluación de los efectos de aglutinantes por concentración

<2-1> Preparación de muestras por concentración

25 Se evaluaron los efectos de aglutinantes por concentración aunque, entre los materiales polisacáridos poliméricos, el ácido hialurónico que mostró el mejor efecto en el Ejemplo 1 se usó como material representativo. El ácido hialurónico se añadió a una cantidad del 0,0001-1 % (p/v) al filtrado de cultivo, seguido de agitación durante 1 hora, y después la mezcla se concentró a presión reducida, preparando de este modo aglutinantes ácido hialurónico con concentraciones diferentes, respectivamente, y estos aglutinantes se cirodesecaron. Cada muestra se diluyó con un tampón fosfato para preparar un 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final de muestra. Se utilizó leche desnatada en polvo como control.

<2-2> Ensayo de la producción de citocina

30 La tasa de producción de citocina en las células esplénicas se investigó para las muestras de aglutinante preparadas en el Ejemplo <2-1> por el mismo método que en el Ejemplo <1-3>. Los resultados se muestran más adelante en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Determinación de la concentración de ácido hialurónico añadido			
Concentración de ácido hialurónico (p/v)	Aumento (%) comparado con control		proporción de IL-4/IL-12
	IL-4	IL-12	
0,0001	9	46	0,19
0,001	7	52	0,13
0,01	10	37	0,27
0,1	12	33	0,36
1	15	25	0,60

5 Como resultados del ensayo, como se muestra en la Tabla 2 anterior, la concentración óptima de ácido hialurónico para preparar un aglutinante de ácido hialurónico fue 0,001 % (p/v), y aquí, la producción de IL-4 se redujo en comparación con la del control, y la producción de IL-12 se aumentó en comparación con la del control.

<Ejemplo 3>

Evaluación de los efectos de bacterias por condición de inactivación por calor

10 Para determinar las condiciones óptimas de inactivación por calor de bacterias, se optimizaron las condiciones de inactivación por calor de acuerdo con la temperatura y tiempo y se evaluó la capacidad adherente a células Caco-2, seleccionando de este modo las condiciones óptimas. Más detalles para el ensayo fueron los siguientes.

<3-1> Preparación de muestras de bacterias inactivadas por calor

15 Se inactivaron por calor bacterias de *Lactobacillus rhamnosus* a 60-120 °C durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos (Calentador, EYELA OSB-2100, China) y se enfriaron a 30 °C antes de usarse como muestras de ensayo. Cada muestra se lavó dos veces con una solución de tampón fosfato, se resuspendieron en 1 ml de la misma solución de tampón y se diluyeron a 1×10^8 células/ml en DMEM libre de suero, antes de usarse para el ensayo.

<3-2> Evaluación de capacidad adherente a mucosa intestinal

20 La monocapa de células Caco-2 se preparó inoculando células Caco-2 (banco coreano de líneas celulares) a $1,2 \times 10^5$ células/ml in medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Hyclone, Estados Unidos) complementado con 10 % (v/v) suero fetal de ternera y 20 µl/ml de gentamicina, dispensando 1 ml del medio resultante en cada pocillo de la placa de cultivo tisular de 6 pocillos, cultivando las células durante 7 días y lavando dos veces con una solución de tampón fosfato.

25 Se puso 1 ml del líquido de muestra preparado en el Ejemplo <3-1> en cada pocillo en el que se formó la monocapa de Caco-2, seguido de reacción durante 90 minutos. Se usó como control 1 ml de DMEM, en lugar de bacterias del ácido láctico inactivadas por calor. Después de la reacción, el sobrenadante se retiró y se añadió 1 ml de Tween 80 al 0,04 % (p/v) para recuperar las bacterias del ácido láctico inactivadas por calor que se adhieren a las células Caco-2, y el recuento bacteriano se midió usando un hemocitómetro. La eficacia de adherencia se calculó como una proporción del recuento bacteriano adherido con respecto al recuento bacteriano inicial (véase Tabla 3).

[Tabla 3]

Tasa de adherencia de acuerdo con una condición de inactivación por calor de bacterias				
	Tasa de adherencia (%) a células Caco-2			
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C

(continuación)

Tasa de adherencia de acuerdo con una condición de inactivación por calor de bacterias					
		Tasa de adherencia (%) a células Caco-2			
Tiempo de inactivación por calor (minutos)	10	44	50	56	45
	20	48	53	68	49
	30	56	63	71	54
	40	60	66	76	42
	50	62	71	80	35
	60	63	72	85	32

5 Como se muestra en la Tabla 3, la eficacia de adherencia fue la más favorable cuando se aplicaron las condiciones de inactivación por calor de 80 °C y 60 minutos. Los elementos constituyentes, tales como ácido lipoteicoico, existentes en la pared celular de bacterias del ácido láctico, inhiben la adherencia de bacterias dañinas, tales como *E. coli* y *Salmonella*, a la superficie de la mucosa intestinal y se unen con TLR-2, que es uno de los receptores de células dendríticas entre las células de la mucosa intestinal, para que se impliquen en la activación de la inmunidad del tracto intestinal humano. Por lo tanto, se establecen las condiciones óptimas de inactivación por calor de bacterias para facilitar la emisión de factores relacionados existentes en la pared celular, por lo que se deja que las bacterias del ácido láctico inactivadas por calor se adhieran al tracto intestinal mientras están en competencia con la flora residente del tracto intestinal y por tanto, en definitiva, puede esperarse la activación de la inmunidad del tracto intestinal.

<Ejemplo 4>

15 **Preparación de *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con aglutinante polisacárido polimérico**

20 La bacteria inactivada por calor a 80 °C durante 60 minutos en el Ejemplo 3 se mezcló con un 0,001 % del aglutinante de ácido hialurónico preparado en el Ejemplo 2 en el que se concentró el filtrado de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus*, seguido de reacción. Un portador, tal como almidón, como vehículo, se mezcló con el material de reacción resultante, seguido de un proceso de secado, preparando de este modo calor *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico (en lo sucesivo en el presente documento, expresado por "RHT-3201"). El efecto de promoción de la inmunidad se comparó relativamente entre RHT-3201 preparado de la manera anterior y *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 como probiótico, por el mismo método que en el Ejemplo <1-3> (véase Tabla 4).

[Tabla 4]

Comparación del efecto de promoción de la inmunidad entre una bacteria probiótica convencional y RHT-3201 de acuerdo con la presente invención		
	RHT-3201	Preparación probiótica
Aumento de IL-4 (%) comparado con control	3	20
Aumento de IL-12 (%) comparado con control	67	29
proporción de IL-4/IL-12	0,04	0,68

25 Como se muestra en la Tabla 4, se verificó que el efecto regulador de citocinas implicadas en Th1/Th2 fue 17 veces mayor en bacterias del ácido láctico de RHT-3201 de la presente invención, en comparación con un probiótico

existente. Se sugiere que el RHT-3201 se preparó de tal forma que este se une de manera favorable a un receptor correspondiente de la mucosa intestinal, tal como TLR-2 durante el proceso de preparación.

<Ejemplo 5>

Análisis estructural a través de microscopio electrónico (FE-SEM)

5 Como para la fase de RHT-3201 preparada en el Ejemplo 4, se realizó un análisis estructural por medio de fotografía usando un microscopio electrónico (FE-SEM, Modelo: LEO SUPRA 55, GENESIS 2000 (Carl Zeiss, EDAX)) de acuerdo con cada proceso de preparación. Los resultados del análisis estructural usando el microscopio electrónico de acuerdo con las etapas de preparación de RHT-3201 se muestran en las FIGs. 1 a 5.

10 Como se muestra en las FIGs. 1 y 2, se observó que, durante los procesos de preparación de aglutinante, el filtrado de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* IDCC 3201 se mezcló con ácido hialurónico, seguido de concentración, por lo que las partículas de ácido hialurónico se volvieron más densas para formar una estructura de un aglutinante (véase FIG. 2). Como se muestra en las FIGs. 3 y 4, se observó que las paredes celulares de bacterias del ácido láctico no se fragmentaron por la inactivación por calor de bacterias en condiciones específicas, pero tiene una estructura expuesta capaz de adherirse con facilidad a la mucosa intestinal (véase FIG. 4). Por último, las bacterias inactivadas por calor se mezclaron con el aglutinante ácido hialurónico para facilitar la adherencia a la mucosa intestinal (véase FIG. 5).

<Ejemplo 6>

Producción en masa de RHT-3201

20 Para investigar la reproducibilidad cuando se produjo en masa RHT-3201 por el método de preparación del Ejemplo 4 anterior, la tasa de adherencia intestinal se comparó entre un probiótico y RHT-3201 producido en masa (véase Tabla 5).

25 Específicamente, se cultivó IDCC 3201 de *Lactobacillus rhamnosus* a 37 °C durante una noche en un tanque de fermentación con una escala de producción de 1 tonelada. El filtrado de cultivo y las bacterias se separaron mediante centrifugación y se añadió ácido hialurónico que tiene un 0,001 % (p/v) del volumen del líquido de cultivo al filtrado de cultivo, seguido de concentración a presión reducida a 50 °C, preparando de este modo un aglutinante, que debe conjugarse con la superficie de la bacteria inactivada por calor. Las bacterias se sometieron a un tratamiento de calor a 80 °C durante 60 minutos, preparando de este modo las bacterias inactivadas por calor. Además, el aglutinante y la bacteria inactivada por calor se mezclaron, se homogeneizaron y se secaron, preparando de este modo RHT-3201. El probiótico de IDCC 3201 de *Lactobacillus rhamnosus* usado como control se preparó de acuerdo con un proceso ordinario para preparar materiales de partida probióticos. Específicamente, las bacterias se obtuvieron desde el mismo líquido de cultivo, se suspendieron en 20 ml de una solución tamponada con fosfato y se criodesecaron, preparando de este modo un polvo bacteriano.

[Tabla 5]

Comparación de tasas de adherencia entre preparación probiótica convencional y RHT-3201 de acuerdo con la presente invención		
	RHT-3201	Preparación probiótica
Tasa de adherencia (%)	85	54

35 Como se muestra en la Tabla 5, se verificó que la tasa de adherencia de RHT-3201 mostraba un 57 % de mejora en comparación con la preparación probiótica de *Lactobacillus rhamnosus*.

<Ejemplo 7>

Evaluación de estabilidad de consumo

<7-1> Estabilidad a ácidos

40 Una preparación de bacterias del ácido láctico se expone a ácidos gástricos cuando pasa a través del estómago del tracto digestivo. Aunque este entorno se reprodujo en condiciones *in vitro*, se realizó la comparación de estabilidad a ácidos entre la bacteria probiótica y RHT-3201 de la presente invención. Mas específicamente, se añadió gota a gota HCl al 10 % en un medio MRS para ajustar el pH a 2,3 y 2,5, y después el MRS se esterilizó para su uso. Se pusieron respectivamente 1 g de las muestras de probiótico y RHT-3201 en el medio MRS con el pH ajustado, seguido de reacción durante 0, 1 y 2 horas. La tasa de adherencia se analizó midiendo el recuento bacteriano

adherido a células Caco-2 por el mismo método que en el Ejemplo <3-2>. Aquí, la bacteria de ácido láctico utilizada en el ensayo fue IDCC 3201 de *Lactobacillus rhamnosus*. Se usaron RHT-3201 preparado por el proceso de preparación del Ejemplo 6 y el probiótico para el ensayo.

[Tabla 6]

Resultados de medición de estabilidad a ácidos de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención								
Muestra de ensayo	pH 2,3 (x10 ⁸ UFC/ml)			Tasa de adherencia (%)	pH 2,5 (x10 ⁸ UFC/ml)			Tasa de adherencia (%)
	0	1 h	2 h		0	1 h	2 h	
Bacteria probiótica	1	0,1	0,04	4	1	0,19	0,07	7
RHT-3201	1	0,7	0,34	34	1	0,83	0,48	48

5 Como se muestra en la Tabla 6, se verificó que, comparada con la bacteria probiótica, la eficacia de adherencia de RHT-3201 de la presente invención se mantenía estable incluso cuando se exponía a un ácido durante 2 horas.

<7-2> Estabilidad a la bilis

10 La circulación enterohepática de ácidos biliares se consigue de manera que los ácidos biliares se producen desde el hígado, se filtran a través del tracto biliar, fluyen hacia el intestino delgado, después se adsorben un 95 % en el íleon, que es la sección final del intestino delgado, y entran de nuevo en el hígado. Los ácidos biliares afectan a la capacidad adherente de bacterias del ácido láctico depositadas en el intestino delgado. Por lo tanto, se comparó la diferencia en la tasa de adherencia entre la bacteria probiótica y RHT-3201 de la presente invención cuando se expone a ácidos biliares. Más específicamente, se usaron los medios MRS con y sin ácidos biliares al 0,3 % añadidos a los mismos después de haberse esterilizado. Después, se inocularon 1 g de la bacteria probiótica y de RHT-3201 de la presente invención en el medio, respectivamente, seguido de reacción durante 2 horas. A continuación, se analizó la tasa de adherencia midiendo el recuento bacteriano adherido a células Caco-2 por el mismo método que en el Ejemplo <3-2>.

20 Aquí, la bacteria de ácido láctico utilizada en el ensayo fue IDCC 3201 de *Lactobacillus rhamnosus*. Se usaron RHT-3201 preparado por el proceso de preparación del Ejemplo 6 y el probiótico para el ensayo.

[Tabla 7]

Resultados de estabilidad a bilis de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención			
Muestra de ensayo	MRS (x10 ⁸ UFC/ml)	MRS+0,3 % de bilis (x10 ⁸ UFC/ml)	Tasa de adherencia (%)
Bacteria probiótica	1	0,23	23
RHT-3201	1	0,57	57

25 Como se muestra en la Tabla 7, se verificó que, cuando se exponen a ácidos biliares durante 2 horas, la eficacia de adherencia de RHT-3201 se mantuvo en un 57 %, que fue aproximadamente 2,5 mayor que la de la bacteria probiótica.

<Ejemplo 8>

Evaluación de estabilidad a lo largo del tiempo por temperatura

<8-1> Ensayo comparativo de estabilidad a lo largo del tiempo a 4 °C entre RHT-3201 y una bacteria probiótica

30 RHT-3201 de la presente invención preparado en el Ejemplo 6 anterior y una bacteria probiótica se almacenaron en un frigorífico a 4 °C durante 365 días, y después se midió a lo largo del tiempo el recuento bacteriano adherido por 1

g de material de partida. Los resultados se muestran en la Tabla 8. El recuento bacteriano adherido se midió por el mismo método que en el Ejemplo <3-2>. La tasa de adherencia se analizó midiendo el recuento bacteriano adherido a células Caco-2.

[TABLA 8]

Ensayo comparativo de estabilidad a lo largo del tiempo a 4 °C entre RHT-3201 de acuerdo con la presente invención y una bacteria probiótica					
Muestra de ensayo	Estabilidad a lo largo del tiempo a 4 °C				Tasa de adherencia residual (%)
	0 días	60 días	180 días	365 días	
Bacteria probiótica	65 %	52%	34%	19%	29,2
RHT-3201	82%	71%	52%	45%	54,8

5

<8-2> Ensayo comparativo de estabilidad con el tiempo a 15 °C entre RHT-3201 y probiótico

RHT-3201 de la presente invención preparado en el Ejemplo 6 anterior y un probiótico se almacenaron en un frigorífico a 15 °C durante 365 días, y después se midió a lo largo del tiempo el recuento bacteriano adherido por 1 g de material de partida. Los resultados se muestran en la Tabla 9. El recuento bacteriano adherido se midió por el mismo método que en el Ejemplo <3-2>. La tasa de adherencia se analizó midiendo el recuento bacteriano adherido a células Caco-2.

10

[Tabla 9]

Ensayo comparativo de estabilidad a lo largo del tiempo a 15 °C entre RHT-3201 de acuerdo con la presente invención y una bacteria probiótica					
Muestra de ensayo	Estabilidad a lo largo del tiempo a 15°C				Tasa de adherencia residual (%)
	0 días	60 días	180 días	365 días	
Bacteria probiótica	65 %	46%	29%	15%	23,1
RHT-3201	82%	66%	59%	38%	46,3

15

<8-3> Ensayo comparativo de estabilidad a lo largo del tiempo a 25 °C entre RHT-3201 y una bacteria probiótica

RHT-3201 de la presente invención preparado en el Ejemplo 6 anterior y una bacteria probiótica se almacenaron en un frigorífico a 25 °C durante 365 días, y después se midió a lo largo del tiempo el recuento bacteriano adherido por 1 g de material de partida. Los resultados se muestran en la Tabla 10. El recuento bacteriano adherido se midió por el mismo método que en el Ejemplo <3-2>. La tasa de adherencia se analizó midiendo el recuento bacteriano adherido a células Caco-2.

20

[Tabla 10]

Ensayo comparativo de estabilidad a lo largo del tiempo a 25 °C entre RHT-3201 de acuerdo con la presente invención y una bacteria probiótica					
Muestra de ensayo	Estabilidad con el tiempo a 25 °C				Tasa de adherencia residual (%)
	0 días	60 días	180 días	365 días	
Bacteria probiótica	65 %	39%	25%	12%	18,4
RHT-3201	82%	56%	49%	35%	42,6

<8-4> Ensayo comparativo de estabilidad a lo largo del tiempo a 37 °C entre RHT-3201 y una bacteria probiótica

5 RHT-3201 de la presente invención preparado en el Ejemplo 6 anterior y un probiótico se almacenaron en un frigorífico a 37 °C durante 365 días, y después se midió a lo largo del tiempo el recuento bacteriano adherido por 1 g de material de partida. Los resultados se muestran en la Tabla 11. El recuento bacteriano adherido se midió por el mismo método que en el Ejemplo <3-2>. La tasa de adherencia se analizó midiendo el recuento bacteriano adherido a células Caco-2.

[Tabla 11]

Ensayo comparativo de estabilidad a lo largo del tiempo a 37 °C entre RHT-3201 de acuerdo con la presente invención y una bacteria probiótica					
Muestra de ensayo	Estabilidad a lo largo del tiempo a 37°C				Tasa de adherencia residual (%)
	0 días	60 días	180 días	365 días	
Bacteria probiótica	65 %	29%	15%	8%	12,3
RHT-3201	82%	46%	44%	32%	39,0

10 **<Ejemplo 9>**

Regulación de producción de citocina por RHT-3201 en modelos *in vitro* inducidos con dermatitis atópica leve

15 En modelos de ratón inducidos con dermatitis atópica leve, se evaluaron los efectos de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención, un probiótico y una preparación bacteriana inactivada, que se produjeron a partir de las misas bacterias del ácido láctico, mientras que el método de ensayo específico fue el siguiente.

<9-1> Preparación de las muestras

RHT-3201 de la presente invención y una preparación probiótica se prepararon por el mismo método que en el Ejemplo 6 anterior, usando un líquido de cultivo preparado cultivando IDCC 3201 de *Lactobacillus rhamnosus* en medio MRS que contenía un 0,1-1 % de polvo lactosérico a 37 °C durante 24 horas.

20 Para las bacterias inactivadas, se obtuvieron bacterias del líquido de cultivo, se suspendieron en 500 µl de una solución tamponada con fosfato y se secaron mediante criodesecado. Las bacterias secas se pesaron y se suspendieron en un tampón fosfato estéril has alcanzar 300 mg/ml. La suspensión se trató con calor a 100 °C durante 30 minutos, por lo que las bacterias se inactivaron. Los tres tipos de muestras se diluyeron con una solución tamponada con fosfato para preparar 1 µg/ml de las muestras finales, respectivamente. Se utilizó leche desnatada en polvo como control.

<9-2> Cultivo de células esplénicas y medición de citocinas

30 Las células esplénicas se prepararon por el mismo método que en el Ejemplo <1-2>. Se añadieron 200 µl de suspensión de células esplénicas (5 x 10⁶ células/ml) y 10 µl (1 µg/ml) de cada líquido de muestra preparado en el Ejemplo <9-1> a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, seguido de cultivo en una incubadora de CO₂ al 5 % durante 7 días. Después de la finalización del cultivo, se midieron los niveles de IL-4 y IL-12 en el líquido de cultivo utilizando un kit Cytoset (Biosource). Los niveles de producción de IL-4 e IL-12 por cada muestra se expresaron como una tasa de aumento de los mismos en comparación con el control como se muestra en la Tabla 12.

[Tabla 12]

Tasa de aumento de citocinas a partir de células esplénicas tras la adición de muestras de bacterias del ácido láctico			
Muestra	Aumento (%) comparado con control		proporción de IL-4/IL-12
	IL-4	IL-12	

(continuación)

Tasa de aumento de citocinas a partir de células esplénicas tras la adición de muestras de bacterias del ácido láctico			
IDCC 3201 de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (bacteria probiótica)	20	29	0,68
IDCC 3201 de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (bacteria inactivada)	12	34	0,35
RHT-3201	3	67	0,04

Como resultados del ensayo, se mostraron un aumento del 20 % en la producción de IL-4 y un aumento del 29 % en la producción de IL-12 en la bacteria probiótica IDCC 3201 de *Lactobacillus rhamnosus*. En la bacteria inactivada se mostraron un aumento del 12 % en la producción de IL-4 y un aumento del 34 % en la producción de IL-12. En RHT-3201 se mostraron un aumento del 3 % en la producción de IL-4 y un aumento del 67 % en la producción de IL-12. Por lo tanto, se verificó que RHT-3201 de la presente invención, que mostró un aumento significativo en la producción de IL-12 y un aumento relativamente leve en la producción de IL-4, tuvo el efecto más excelente en la regulación de producción de citocina.

10 <Ejemplo 10>

Efecto terapéutico de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención en modelos *in vivo* inducidos con dermatitis atópica grave

<10-1> Preparación de material de ensayo y antígeno inducible

Se usó RHT-3201 de acuerdo con la presente invención como material de ensayo, mientras que dexametasona basada en esteroides (Sigma Co. Ltd), que se usa como un agente terapéutico principal para la dermatitis atópica grave, se usó como control positivo. Un extracto de *Dermatophagoides farina*, que es una especie principal de ácaro del polvo doméstico, se usó como material inductor de atopía. El extracto se adquirió en forma de ungüento de Central Lab. Animal Inc.

La dexametasona se preparó disolviéndola en etanol a una concentración de 0,1 % (p/v), y se preparó RHT-3201 de la presente invención disolviéndolo en agua destilada a dosis de 1×10^8 UFC/0,5 ml/ratón, 1×10^9 UFC/0,5 ml/ratón y 1×10^{10} UFC/0,5 ml/ratón, respectivamente. Todas las muestras que iban a administrarse se prepararon en el día del ensayo. La dexametasona se recubrió sobre la piel de un sujeto de ensayo a 100 μ l para cada sujeto dos veces por semana, mientras que el RHT-3201 de acuerdo con la presente invención se administró por vía oral a 0,5 ml para cada sujeto usando una sonda para ratones una vez al día. Se administró agua destilada para un grupo normal y un grupo de control de atopía. La administración se realizó durante 8 semanas en todos los grupos de ensayo.

<10-2> Preparación y cría de animales de ensayo

Se adquirieron ratones NC/Nga hembra (de 6 semanas de edad) de Central Lab. Animal Inc., y se aclimataron durante 1 semana antes de su uso. El entorno de cría fue como se indica a continuación: se mantuvieron temperatura constante (22 ± 2 °C) y humedad constante (50-60 %), mientras que los ciclos de luz (08:00~20:00) y oscuridad (20:00~08:00) se controlaron a un intervalo de 12 horas. Se asignaron y criaron en cada jaula de polisulfona, alimentándolos con acceso libre a la dieta de ensayo y agua durante 24 horas.

<10-3> Inducción de dermatitis atópica grave

Las áreas de dosificación hasta las porciones superiores de las aurículas de los ratones NC/Nga de 7 semanas de edad se rasuraron por completo y después se rociaron con 150 μ l de una solución acuosa de dodecilsulfato sódico al 4 % (SDS) sobre las partes rasuradas. Después de secarse por completo, se recubrieron uniformemente 100 mg de un ungüento para ácaros del polvo (extracto de ácaros) sobre las partes rasuradas. El ungüento para ácaros del polvo (extracto de ácaros) se recubrió dos veces a la semana durante tres semanas, un total de seis veces, para inducir una dermatitis moderada o más grave. Después de eso, el ungüento se recubrió una vez a la semana durante un periodo de administración a los grupos de ensayo (8 semanas), manteniendo de este modo una dermatitis atópica grave.

[Tabla 13]

Puntuaciones de la inducción de dermatitis atópica grave en cada modelo antes del tratamiento con materiales de ensayo		Puntuación de dermatitis atópica grave Mean ± "EE" (n = 6)
Grupo normal		0
Control de atopía (Vehículo)		11,0 ± 0,4
Dexametasona (Control positivo)		10,8 ± 0,4
RHT-3201	1 x 10 ⁸ UFC/ratón	10,8 ± 0,4
	1 x 10 ⁹ UFC/ratón	10,7 ± 0,3
	1 x 10 ¹⁰ UFC/ratón	10,7 ± 0,3

5 Como se muestra en la Tabla 13, como resultado de inducir una dermatitis atópica grave recubriendo el ungüento para ácaros del polvo (extracto de ácaros) sobre ratones NC/Nga durante tres semanas, la puntuación media para cada grupo fue 10 o superior, por lo que se prepararon ratones NC/Nga con dermatitis atópica grave.

<10-4> Evaluación de dermatitis atópica

10 En la presente evaluación, la gravedad de la dermatitis atópica se expresó como un total de puntuaciones de evaluación de cinco artículos, usando SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis), que es un método utilizado generalmente para la evaluación clínica macroscópica. Los artículos fueron eritema, piel seca, edema, excoriación y liquenificación. Se sumaron las puntuaciones para los cinco artículos (ningún síntoma (puntuación 0), síntoma leve (puntuación 1), síntoma moderado (puntuación 2), síntoma grave (puntuación 3) para cada artículo), mientras que la puntuación de evaluación se determinó entre la puntuación más baja de 0 (un estado en el que no existe ningún síntoma) y la puntuación más alta de 15 (un estado en el que los síntomas para todos los artículos fueron graves). La gravedad de las lesiones cutáneas de los ratones se evaluó cada semana (véase FIG. 6).

15 En la FIG. 6, vehículo representa los resultados para el grupo de ratones que tienen dermatitis atópica grave inducida por ácaros del polvo, y dexametasona representa los resultados para el grupo de ratones que tienen la piel recubierta con medicación usando dexametasona como control positivo durante 8 semanas. RHT-3201 10⁸, RHT-3201 10⁹ y RHT-3201 10¹⁰ representan los resultados para los grupos de ratones que tienen dermatitis atópica grave inducida por ácaros del polvo administrados con RHT-3201 de la presente invención a concentraciones diferentes: RHT-3201 10⁸ representa los resultados para el tratamiento del grupo de ratones administrados por vía oral a 1 x 10⁸ UFC/ratón durante 8 semanas; RHT-3201 10⁹ representa los resultados para el tratamiento del grupo de ratones administrados por vía oral a 1 x 10⁹ UFC/ratón durante 8 semanas; y RHT-3201 10¹⁰ representa los resultados para el tratamiento del grupo de ratones administrados por vía oral a 1 x 10¹⁰ UFC/ratón durante 8 semanas.

25 Como resultado de investigar el efecto de aliviar la dermatitis atópica grave después de 8 semanas de tratamiento, se verificó a partir de los resultados de la FIG. 6 que la puntuación de la dermatitis atópica grave en el grupo de vehículo sin ningún tratamiento medicinal fue, como valor medio, 8,0, indicando que se mantuvo el estado de gravedad inicial. En comparación con el grupo de ratones que tenía dermatitis atópica grave inducida por ácaros del polvo (grupo de vehículo), la evaluación de la gravedad de las lesiones cutáneas en ratones había descendido significativamente en todos los grupos tratados con RHT-3201 10⁸, RHT-3201 10⁹ y RHT-3201 10¹⁰, respectivamente. Más específicamente, el grupo de administración de RHT-3201 10⁸ mostró una puntuación de dermatitis atópica grave de 4,2, dando como resultado una eficacia de alivio de dermatitis atópica grave del 47,5 %. El grupo de administración de RHT-3201 10⁹ mostró una puntuación de dermatitis atópica grave de 2,3, dando como resultado una eficacia de alivio de dermatitis atópica grave del 71,25%. El grupo de administración de RHT-3201 10¹⁰ mostró una puntuación de dermatitis atópica grave de 2,7, dando como resultado una eficacia de alivio de dermatitis atópica grave del 66,25%.

40 Se sabe generalmente que las preparaciones de bacterias del ácido láctico necesitan tomarse en grandes cantidades sin ningún informe sobre las concentraciones óptimas de tales preparaciones para obtener el efecto de aliviar la dermatitis atópica grave. La razón es que, como en el caso de los probióticos de ácido láctico, las bacterias del ácido láctico se destruyen en grandes cantidades por los ácidos gástricos y biliares mientras pasan por el tracto

gastrointestinal, provocando la reducción en la eficacia de adherencia a la mucosa intestinal capaz de mostrar acciones inmunes, y por tanto son excretadas por el cuerpo. A diferencia de esto, se demostró que RHT-3201 de la presente invención posee definitivamente un efecto terapéutico a sus diferentes concentraciones. Las unidades de consumo de $\times 10^9$ y $\times 10^{10}$ mostraron similitud dentro de un intervalo de error con respecto a la eficacia del alivio de la dermatitis atópica grave. La razón es que el número de combinación con el receptor de tipo Toll distribuido en células dendríticas de la mucosa intestinal se satura para tener un umbral.

La FIG. 7 ilustra resultados de observación macroscópica del efecto terapéutico de *Lactobacillus* RHT-3201 sobre la dermatitis atópica grave tras su administración oral. En las lesiones cutáneas del grupo de vehículo, se observaron claramente piel seca, eritema, edema, liquenificación y arañazos debidos al rascado continuo inducido por prurito. Se investigó macroscópicamente que la gravedad de la dermatitis atópica se mejoró en los grupos de administración de RHT-3201 de todas las concentraciones.

<10-5> Comportamiento de rascado y medición del peso corporal

El número de comportamientos de rascado durante 15 minutos se contó una vez a la semana desde la semana 1 de la administración de un fármaco de ensayo. Sólo se contó el número de comportamientos de rascado usando una pata trasera para evitar contar comportamientos de rascado debidos a otras causas además de los comportamientos de rascado debidos a prurito. Por otra parte, la pérdida de peso tiende a ocurrir debido a los efectos secundarios de los fármacos y el estrés en el momento de inducir dermatitis atópica grave. Para investigar si el efector secundario de la pérdida de peso sucede por los materiales de ensayo de la presente invención, los animales de ensayo se pesaron durante el periodo de administración de los materiales de ensayo.

Como se muestra en la FIG. 8, se midió que el número de comportamientos de rascado era de 100/h o inferior en todos los grupos de administración de material de ensayo durante ocho semanas, mientras que el número de comportamientos de rascado mostró una tendencia descendiente cada semana, en comparación con el grupo de vehículo. En las semanas 3, 6 y 8, hubo significancias en los grupos administrados con RHT-3201 con todas las concentraciones en comparación con el grupo de vehículo.

Además, como se muestra en la FIG. 9, la administración transdérmica de dexametasona como control positivo durante ocho semanas provocó una pérdida de peso durante 4 semanas, mientras que la administración de RHT-3201 de la presente invención mostró un aumento de peso de la misma manera que en el grupo normal, no provocando ningún efecto secundario de pérdida de peso, y por tanto se confirmó que RHT-3201 de la presente invención era seguro.

<10-6> Medición del nivel de IgE en suero

Después de la administración de los fármacos de ensayo durante ocho semanas, se tomó sangre a través del plexo venoso retro-orbital y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos para separar el suero. El nivel de IgE en suero se midió usando un kit ELISA (SHIBAYAGI, Japón).

Como se muestra en la FIG. 10, con respecto al IgE que se sabe que aumenta específicamente en el momento de inducir dermatitis atópica grave, los grupos de administración de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención mostraron efectos inhibidores significativos, mientras que, especialmente, en la evaluación comparativa entre diferentes concentraciones, la unidad de consumo de $\times 10^9$ mostró el mayor efecto inhibidor.

<10-7> Capacidad de producción de citocina de células de los ganglios linfáticos

Después de la finalización de la administración de los materiales de ensayo, se sacrificó cada uno de los ratones NC/Nga inducidos con dermatitis atópica grave. Se midió el tamaño y el peso de los ganglios linfáticos axilares. Además, las suspensiones celulares obtenidos de los ganglios linfáticos axilares se dispensaron en el medio RPMI-1640 (que contenía un 10 % de FBS, un 1 % de penicilina y un 1 % de estreptomycin) a una concentración de 5×10^6 células/ml. El extracto de ácaros del polvo (*D. farina*) se añadió para obtener una concentración final de $10 \mu\text{g/ml}$ y se cultivó durante 48 horas en una incubadora de CO_2 al 5 % a 37°C . El sobrenadante se recogió para medir los rendimientos de producción de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12 usando un kit ELISA (fabricante de IFN- γ e IL-4: R&D SYSTEMS, Estados Unidos; y fabricante de IL-10 e IL-12: SIGMA ALDRICH, Estados Unidos).

Como se muestra en la FIG. 11, los ganglios linfáticos axilares se implicaron en la respuesta inmunitaria de la piel dorsal de ratones NC/Nga, mientras que los ganglios linfáticos del grupo de vehículo se agrandaron debido a la exposición al antígeno de ácaros del polvo (extracto de ácaros). Como se muestra en las FIGs. 12 y 13, los valores de medición de volumen y peso de los ganglios linfáticos fueron 70 mm^3 y 35 mg, respectivamente, que eran 5 veces y 7 veces mayores en comparación con el grupo normal. Mientras que el tamaño de los ganglios linfáticos axilares en los ratones NC/Nga inducidos con dermatitis atópica grave se redujo significativamente en los grupos de administración de RHT-3201.

Para la confirmación de la capacidad de producción de citocina de acuerdo con la administración de RHT-3201, el ganglio linfático axilar en los ratones NC/Nga inducidos con dermatitis atópica grave se expuso al antígeno de ácaros del polvo y después se midieron los niveles de citocinas implicadas en la respuesta inmunitaria. Los

resultados se muestran en las FIGs. 14 a 21. Se verificó que la administración de RHT-3201 de la presente invención redujo significativamente la citocina IFN- γ de tipo Th1 (véase FIG. 14) y un inductor de la misma, IL-12 (véase FIG. 15), en comparación con el vehículo. También se verificó que la administración de RHT-3201 de la presente invención redujo significativamente la citocina IL-4 de tipo Th2 (véase FIG. 16), en comparación con el vehículo. Las células secretoras principales de IL-10 en los ganglios linfáticos, es decir, linfocitos T reguladores, realizan una acción inmunosupresora de inhibir la reacción de Th1 y Th2. También se verificó que la administración de RHT-3201 redujo significativamente IL-10 (véase FIG. 17), en comparación con el vehículo.

Para la comparación del mecanismo de acción de RHT-3201 en dermatitis atópica grave, se mostró la proporción de citocina de tipo Th1/citocina de tipo Th2 para los niveles de citocinas expresadas en cada grupo de administración. Como resultado, como se muestra en la FIG. 18, la proporción de IL-4/IFN- γ no fue diferente entre los grupos de administración de RHT-3201 en comparación con el grupo de vehículo. Estos resultados son diferentes de la reacción de citocina de tipo Th1/citocina de tipo Th2 de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención en la dermatitis atópica leve en el Ejemplo 9, mostrando que RHT-3201 de acuerdo con la presente invención tubo un mecanismo de acción diferente en dermatitis atópica grave. Es decir, se verificó que el mecanismo de acción de RHT-3201 de acuerdo con la presente invención se varió de acuerdo con la gravedad de la dermatitis atópica.

Para la confirmación de que el factor de acción implicado en la inhibición de linfocitos T reguladores (Treg) como otro mecanismo de acción de RHT-3201 de la presente invención sobre la dermatitis atópica grave es citocina IL-10, la proporción de IFN- γ /IL-10 (véase FIG. 19), la proporción de IL-4/IL-10 (véase FIG. 20) y la proporción de IL-12/IL-10 (véase FIG. 21) se compararon y analizaron. Como resultado, se verificó que los valores de proporción se disminuyeron significativamente en los grupos de administración de RHT-3201 de la presente invención. Por tanto, se demostró que IL-10 es un factor de acción implicado en el tratamiento de dermatitis atópica grave, y esta citocina aumenta la capacidad de Treg, mostrando así el efecto de tratamiento de la dermatitis atópica grave.

<10-8> Observación histopatológica

Se extrajeron las pieles dorsales de los ratones NC/Nga, se fijaron en formalina al 10 % y se incluyeron en parafina, y se cortaron finamente a un espesor de 4 μ m, preparando de este modo un portaobjetos. Posteriormente, se observaron los cambios en el espesor de la epidermis y la dermis mediante una tinción de hematoxilina y eosina (H&E), mientras que los mastocitos de confirmaron por una tinción de azul de toluidina. El espesor de la piel y el número de mastocitos se calcularon mediante observación usando un microscopio óptico de 100 y 400 aumentos.

Como resultado de observar los tejidos cutáneos dorsales de los ratones NC/Nga mediante tinción H&E, como se muestra en la FIG. 22, el grupo de vehículo con dermatitis atópica inducida por exposición a ácaros del polvo mostró hallazgos histopatológicos de espesor dilatado provocado por el engrosamiento de la capa epidérmica hacia la capa dérmica en comparación con el grupo normal y una infiltración aumentada de células inflamatorias. Mediante observación microscópica, los grupos de administración de RHT-3201 de la presente invención mostraron una infiltración reducida de células inflamatorias; una inhibición significativa sobre la expansibilidad del espesor epidérmico (véase FIG. 23) y la expansibilidad del espesor dérmico (véase FIG. 24), que se observan para la inducción de dermatitis atópica, en comparación con el grupo de vehículo.

Como resultado de observar los tejidos cutáneo dorsales de los ratones NC/Nga mediante una tinción de azul de toluidina, se verificó que los mastocitos se infiltraron adicionalmente en los tejidos cutáneos en el grupo de vehículo con dermatitis atópica inducida debido a exposición a ácaros del polvo, que es un material antígeno inductor de dermatitis atópica, en comparación con el grupo normal (véase FIG. 25). En dermatitis atópica grave, el número de mastocitos suele aumentar en función de su duración. Como se muestra en la FIG. 26, se verificó que el número total de mastocitos aumentó en los tejidos cutáneos de los ratones (vehículo) expuestos a ácaros del polvo durante 11 semanas, mientras que el número de mastocitos en ratones inducidos con dermatitis atópica grave disminuyó significativamente en los grupos administrados con RHT-3201 durante ocho semanas. Por lo tanto, se considera que RHT-3201 de acuerdo con la presente invención muestra un efecto significativo en el alivio de la dermatitis atópica grave.

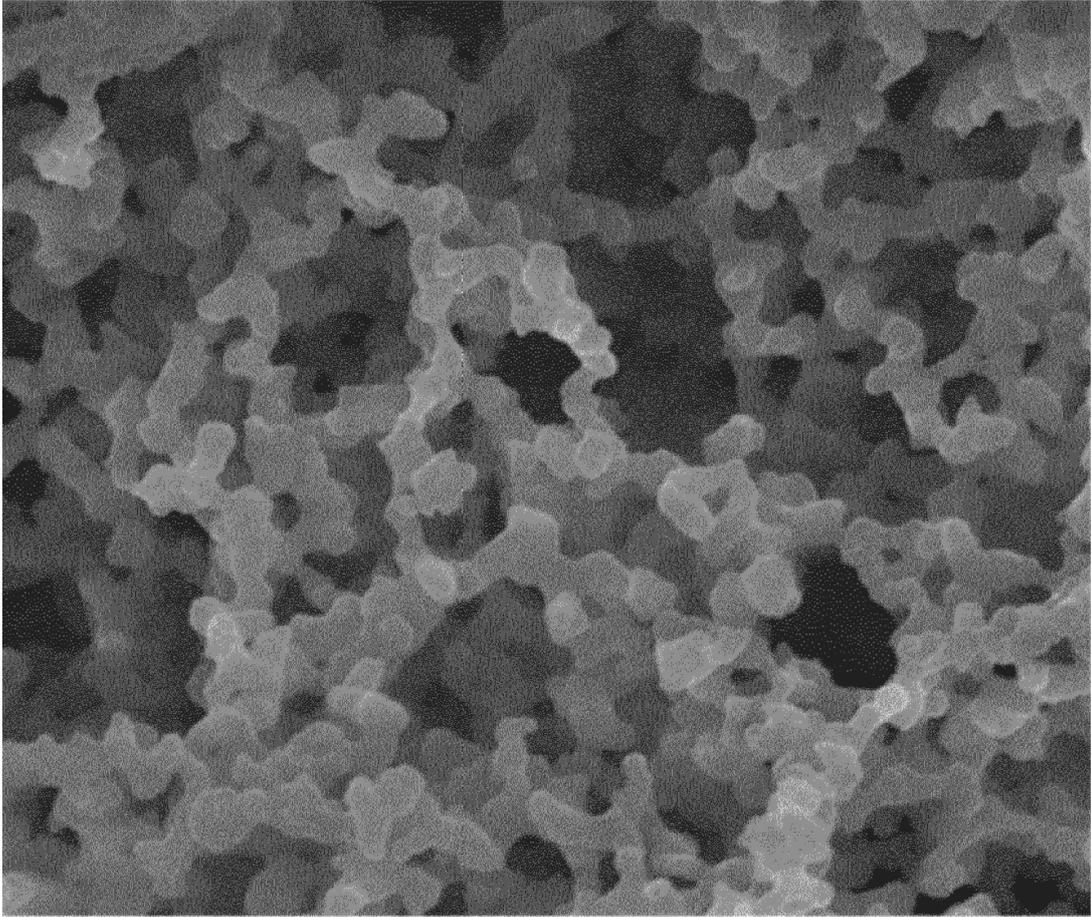
Aplicabilidad industrial

Como se ha expuesto anteriormente, la presente invención se refiere a *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, un método para preparar la misma y un uso de la misma. La *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de la presente invención posee un excelente efecto terapéutico sobre enfermedades atópicas, especialmente, mejora significativamente la competitividad adherente a la mucosa intestinal de preparaciones de bacterias del ácido láctico convencionales y muestra un efecto de prevención, alivio o tratamiento sobre la dermatitis atópica a un nivel equivalente al de un fármaco basado en esteroides. Por lo tanto, la presente invención es altamente aplicable de un modo industrial.

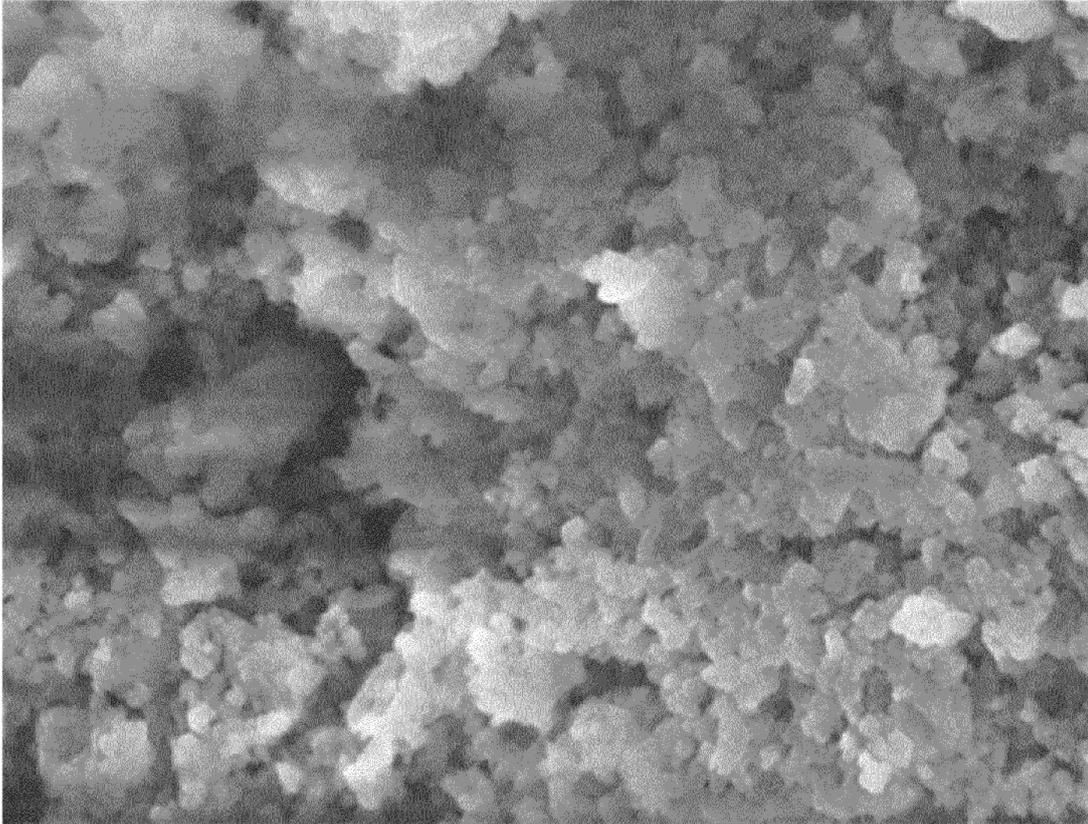
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, comprendiendo el método:
- 5 (a) separar un medio de cultivo de fermentación preparado cultivando *Lactobacillus rhamnosus* en bacterias y un filtrado de fermentación;
 (b) mezclar el filtrado de fermentación de la etapa (a) y un polisacárido polimérico para preparar un aglutinante polisacárido polimérico;
 (c) inactivar por calor las bacterias separadas en la etapa (a); y
 (d) conjugar las bacterias inactivadas por calor de la etapa (c) con el aglutinante preparado en la etapa (b).
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la *Lactobacillus rhamnosus* es *Lactobacillus rhamnosus* RHT-3201 (*Lactobacillus rhamnosus* KCTC 10833BP).
3. El método de la reivindicación 1, en el que el polisacárido polimérico en la etapa (b) es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, alginato, maltodextrina y quitosano.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el polisacárido polimérico en la etapa (b) es ácido hialurónico.
- 15 5. El método de la reivindicación 4, en el que el ácido hialurónico se mezcla con el filtrado de fermentación a una proporción de 0,0001-1 % (p/v).
6. El método de la reivindicación 1, en el que la inactivación por calor en la etapa (c) se realiza a un intervalo de temperaturas de 60-100 °C.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en el que la inactivación por calor en la etapa (c) se realiza durante 10-120 minutos.
8. Una *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico, preparada por un método que comprende:
- 25 (a) separar un medio de cultivo de fermentación preparado cultivando *Lactobacillus rhamnosus* en bacterias y un filtrado de fermentación;
 (b) mezclar el filtrado de fermentación de la etapa (a) y un polisacárido polimérico para preparar un aglutinante polisacárido polimérico;
 (c) inactivar por calor las bacterias separadas en la etapa (a) que se realiza a un intervalo de temperaturas de 60-100 °C y/o durante 10-120 minutos; y
 (d) conjugar las bacterias inactivadas por calor de la etapa (c) con el aglutinante preparado en la etapa (b).
- 30 9. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención y tratamiento de la dermatitis atópica, conteniendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de la reivindicación 8.
10. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición contiene la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico a una
 35 concentración de 10^8 a 10^{10} UFC/g.
11. Una composición alimentaria para su uso en la prevención y alivio de la dermatitis atópica, conteniendo la composición, como principio activo, la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico de la reivindicación 8.
- 40 12. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el alimento se selecciona entre el grupo que consiste en leche fermentada, yogur, bebidas, bebidas lácteas, aditivos alimentarios y alimentos funcionales saludables.
13. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la composición contiene la *Lactobacillus rhamnosus* inactivada por calor conjugada con un aglutinante polisacárido polimérico a una concentración de 10^8 a 10^{10} UFC/g.

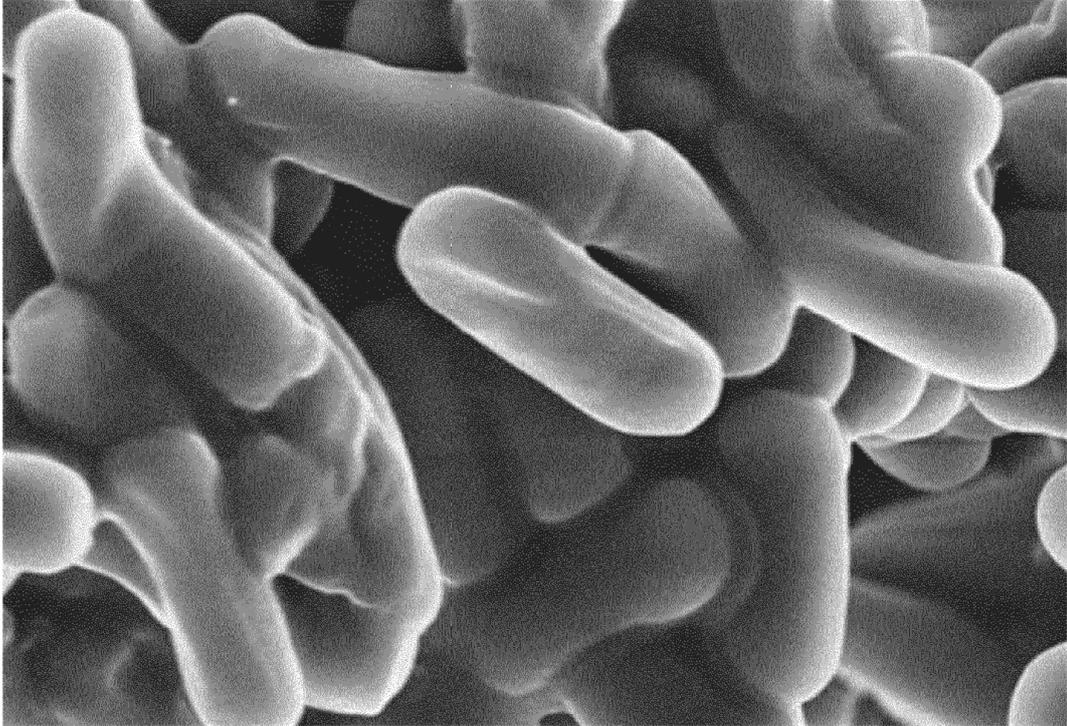
【 FIG 1】



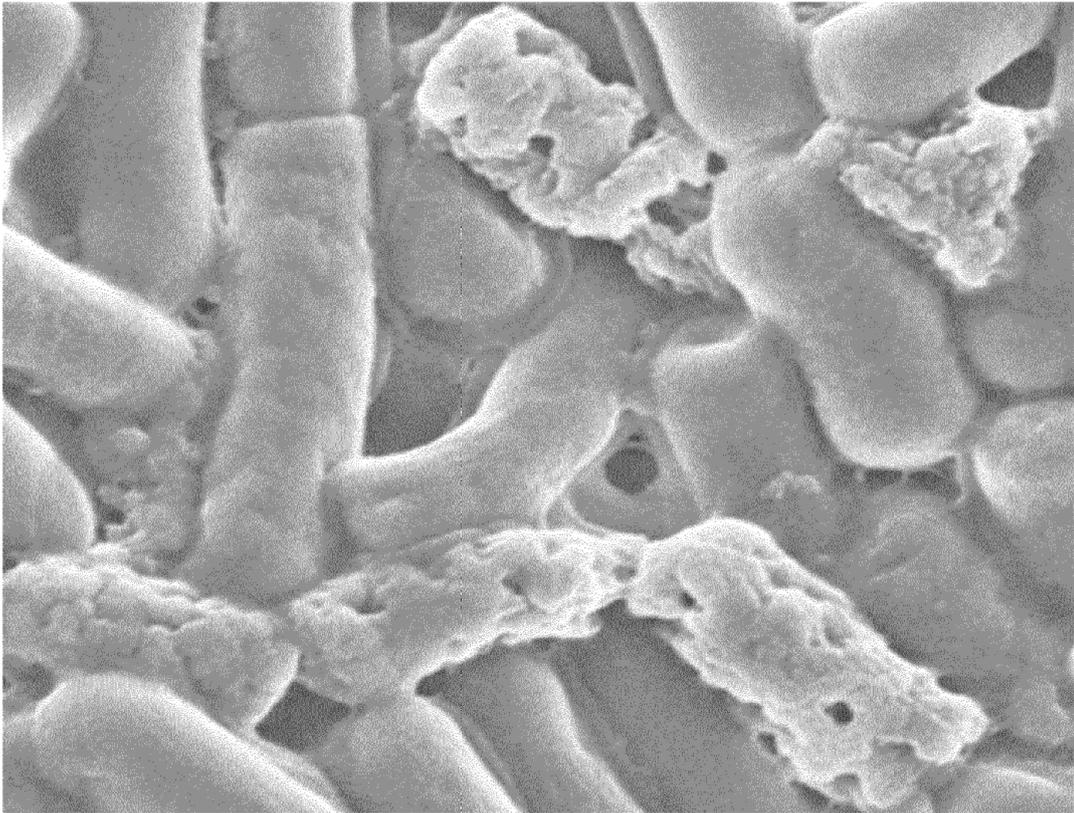
【 FIG 2】



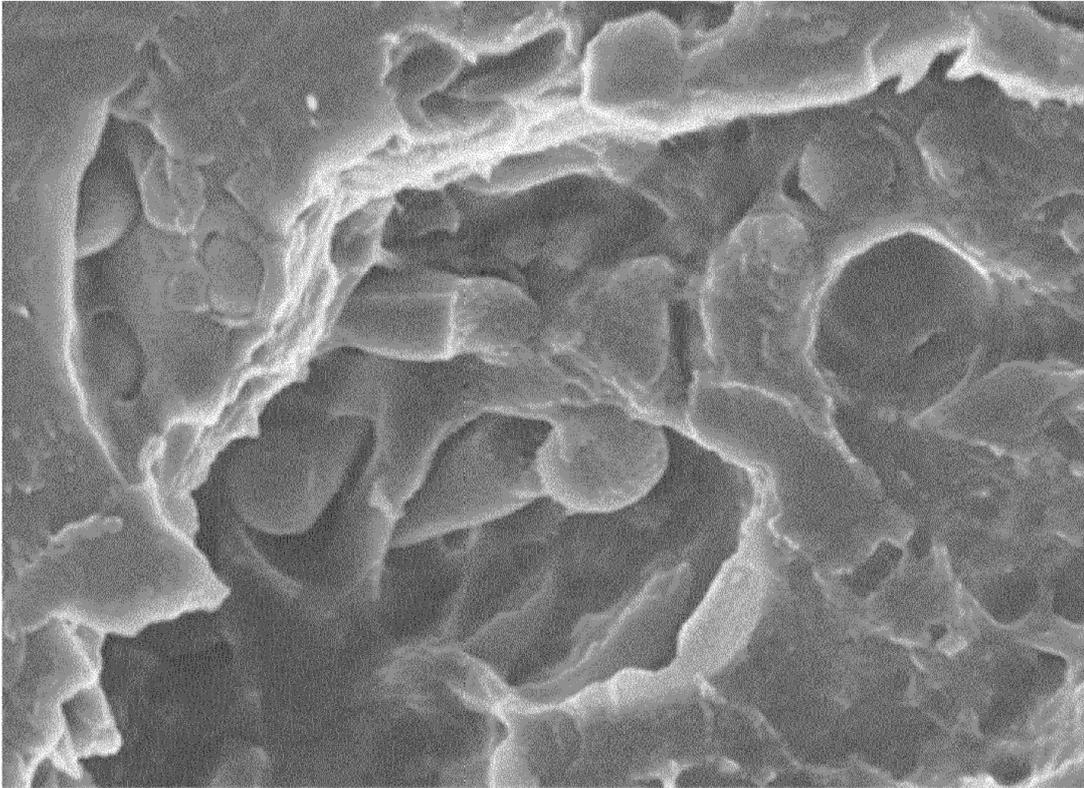
【 FIG 3】



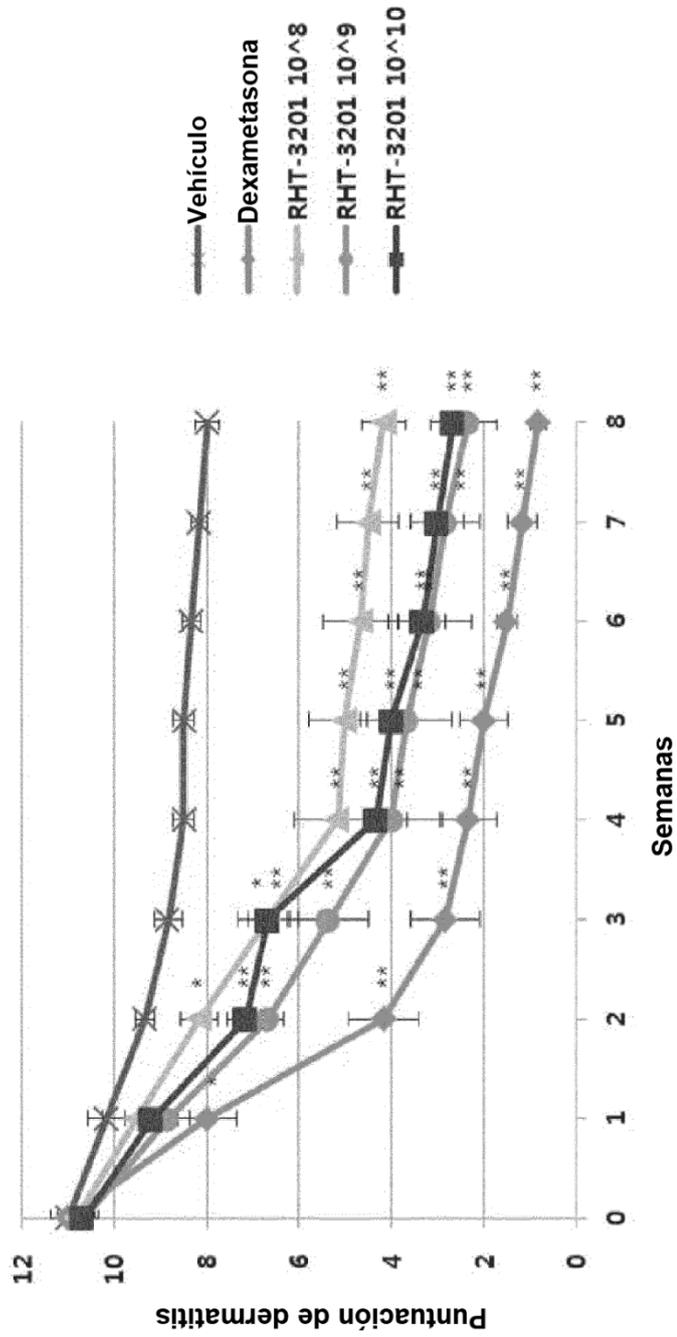
【 FIG 4】



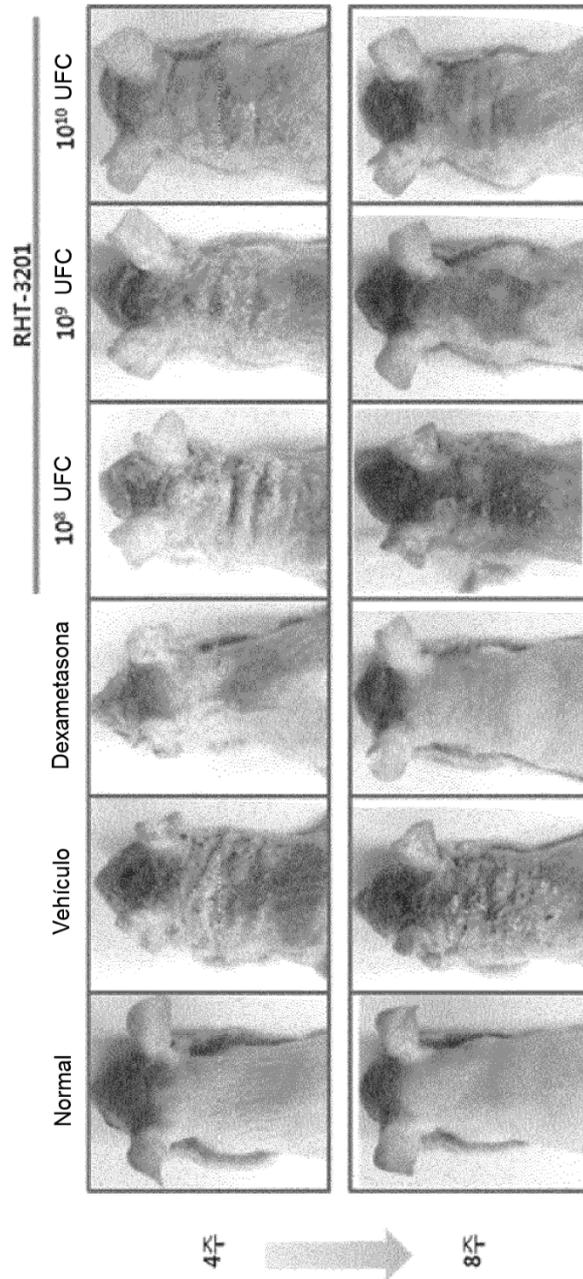
【 FIG 5】



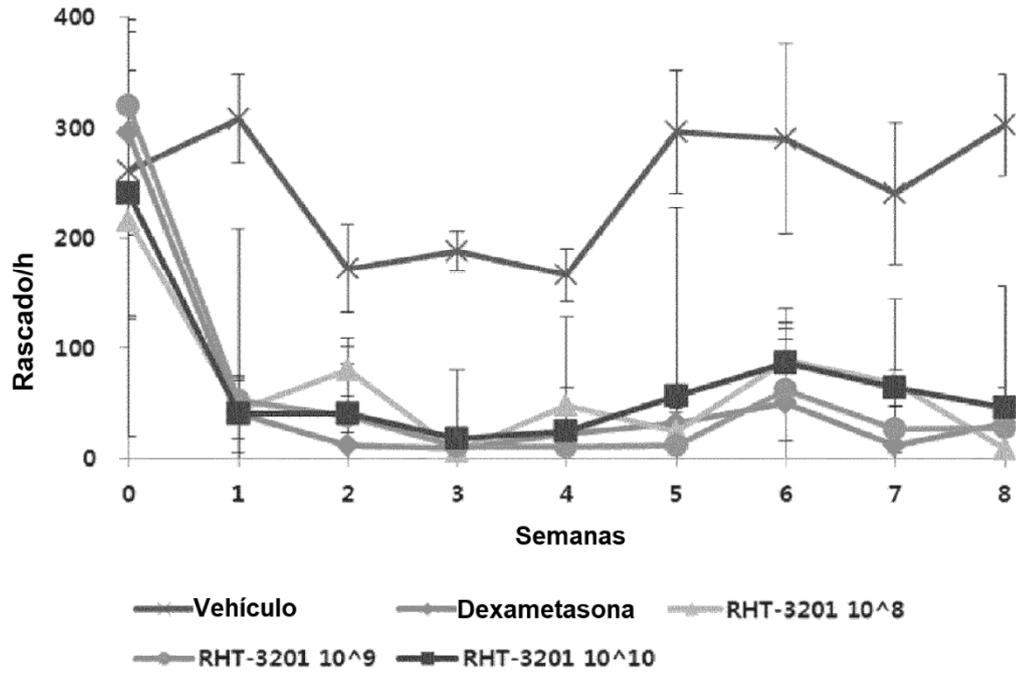
【 FIG 6】



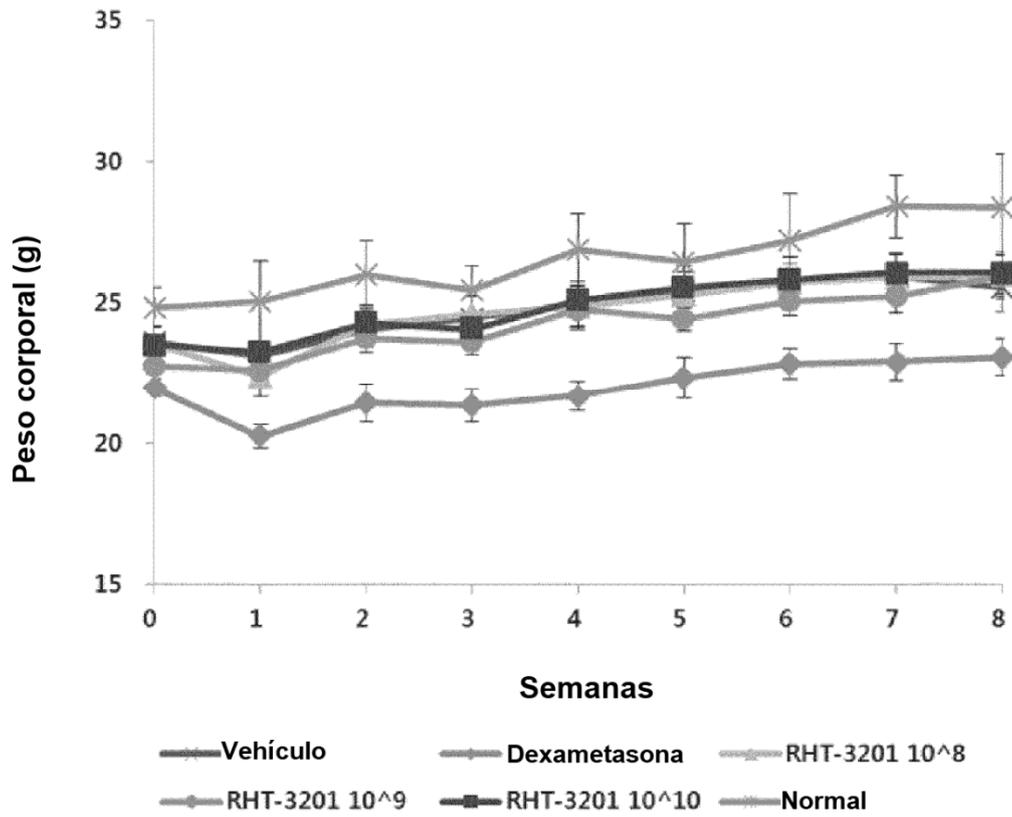
【 FIG 7】



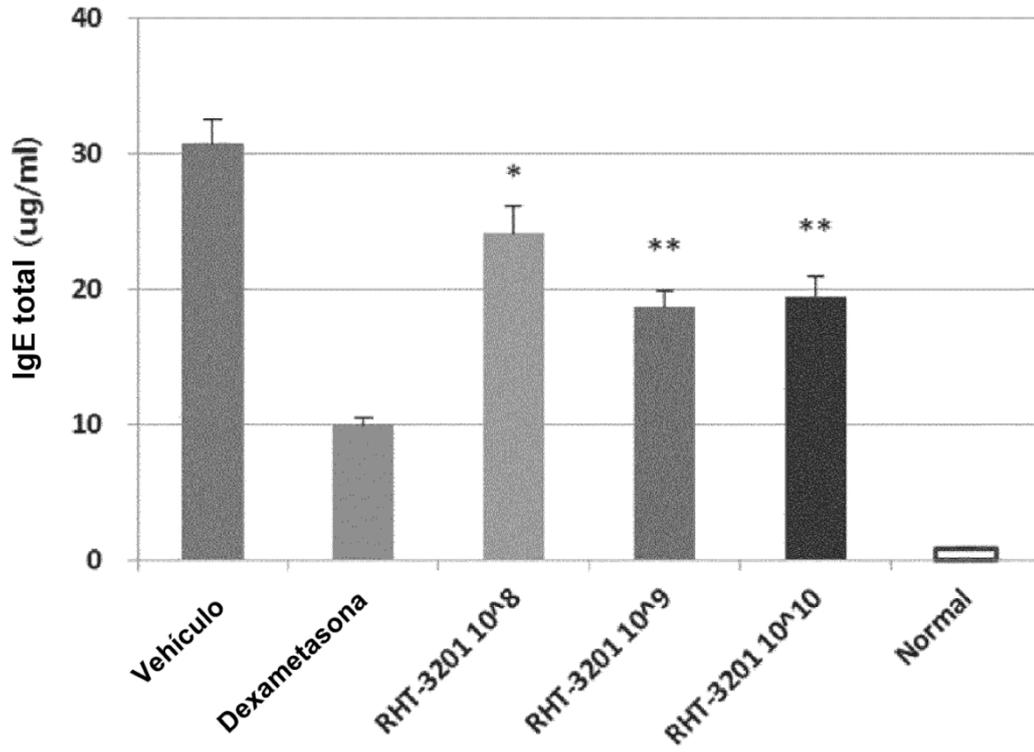
【 FIG 8】



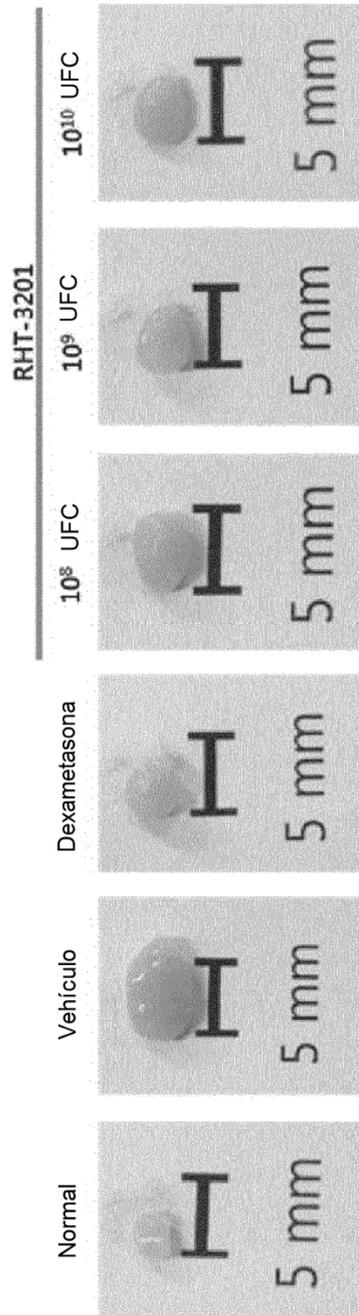
【 FIG 9】



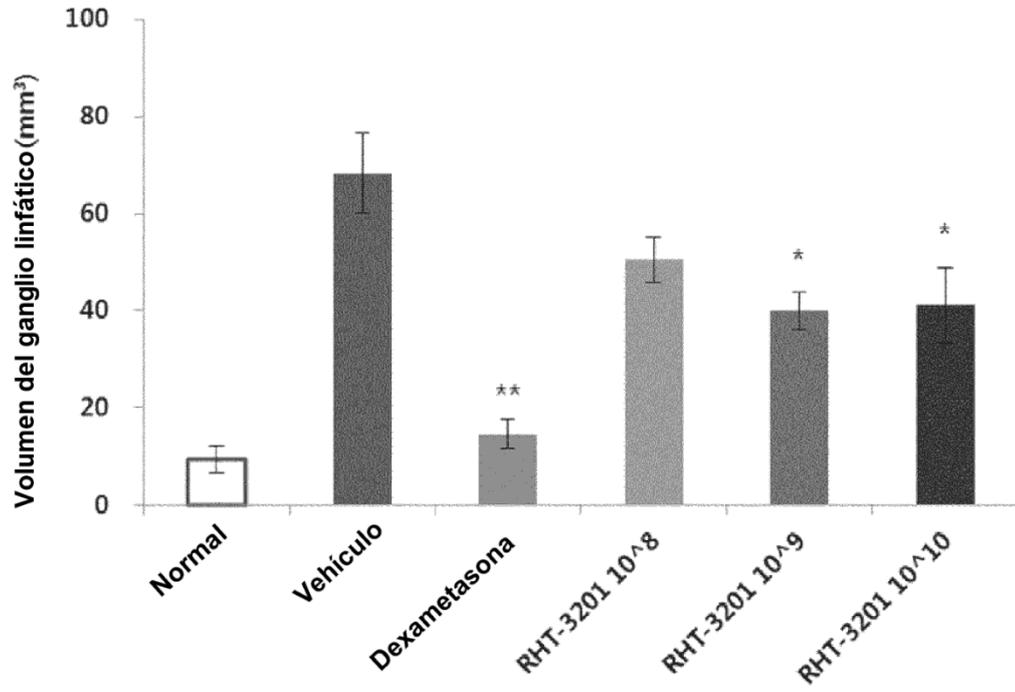
【 FIG 10】



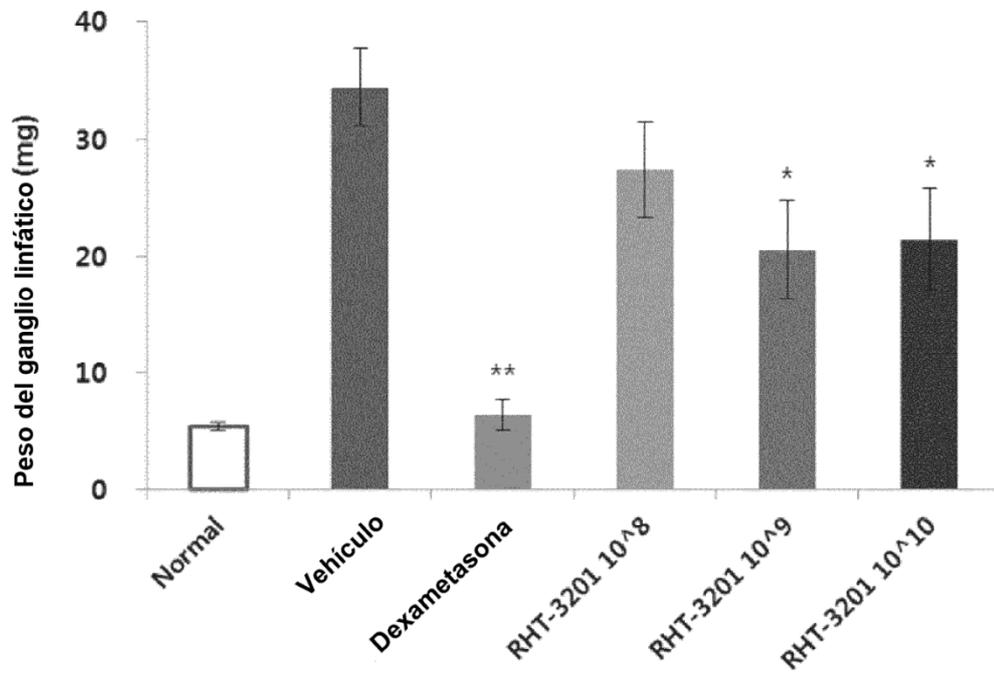
【 FIG 11】



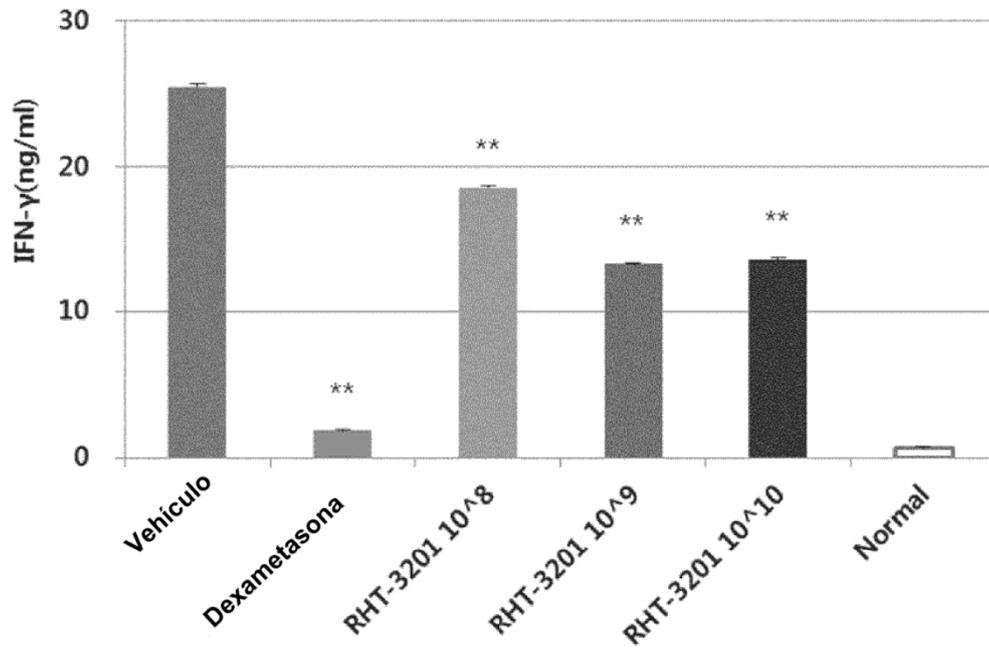
【 FIG 12】



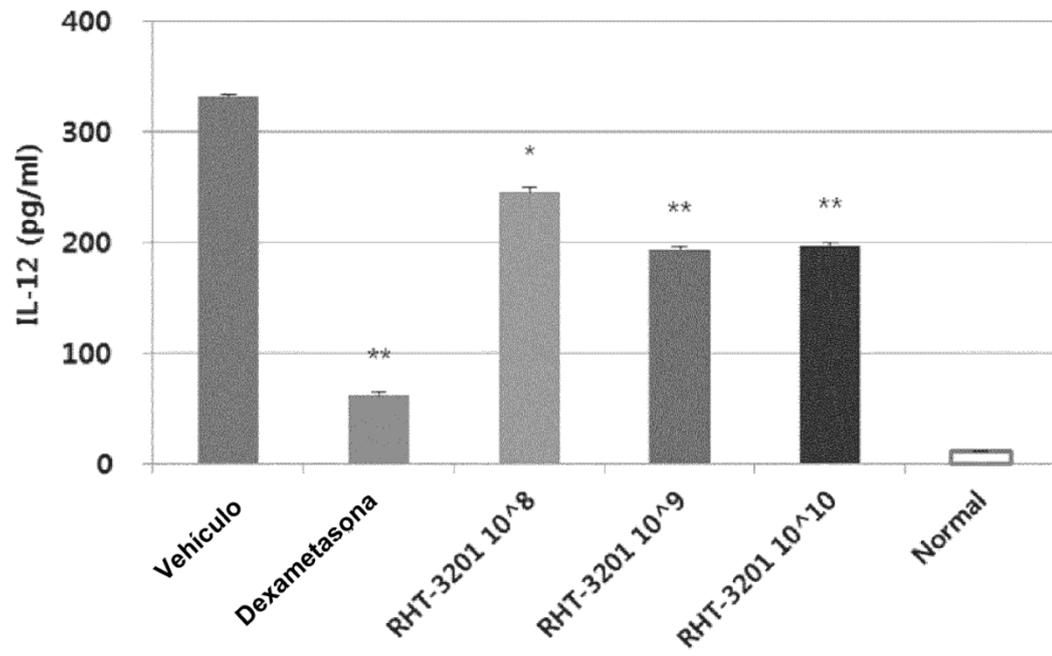
【 FIG 13】



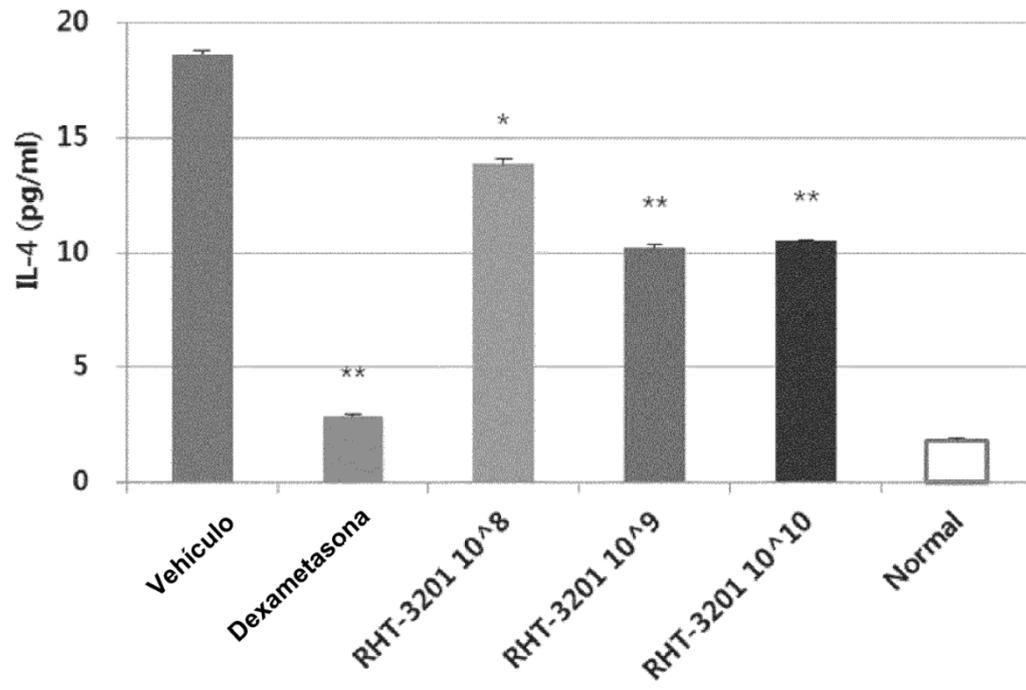
【 FIG 14】



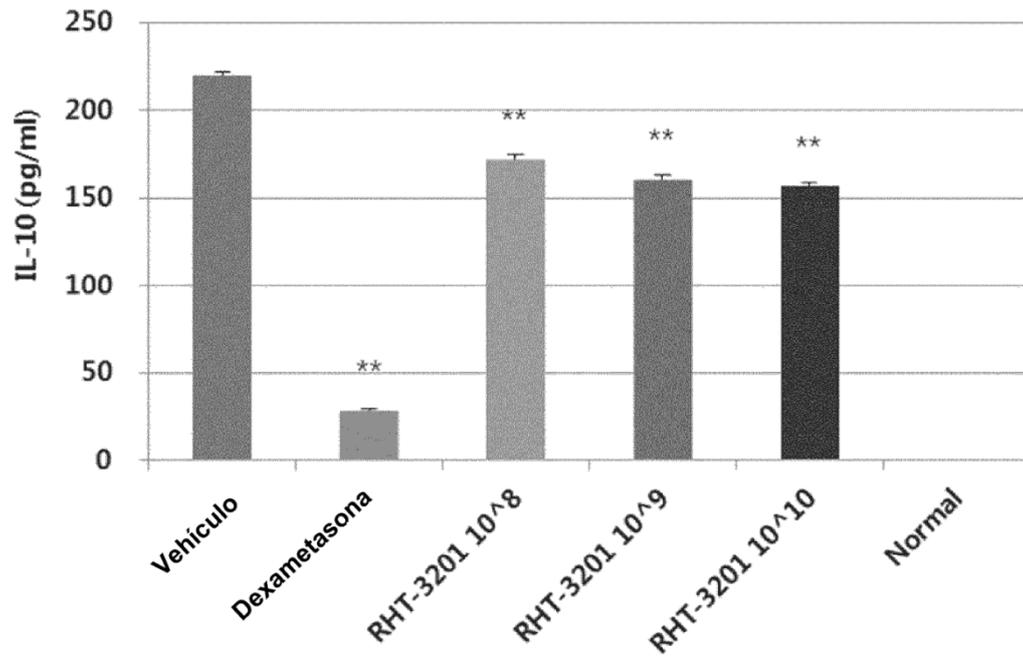
【 FIG 15】



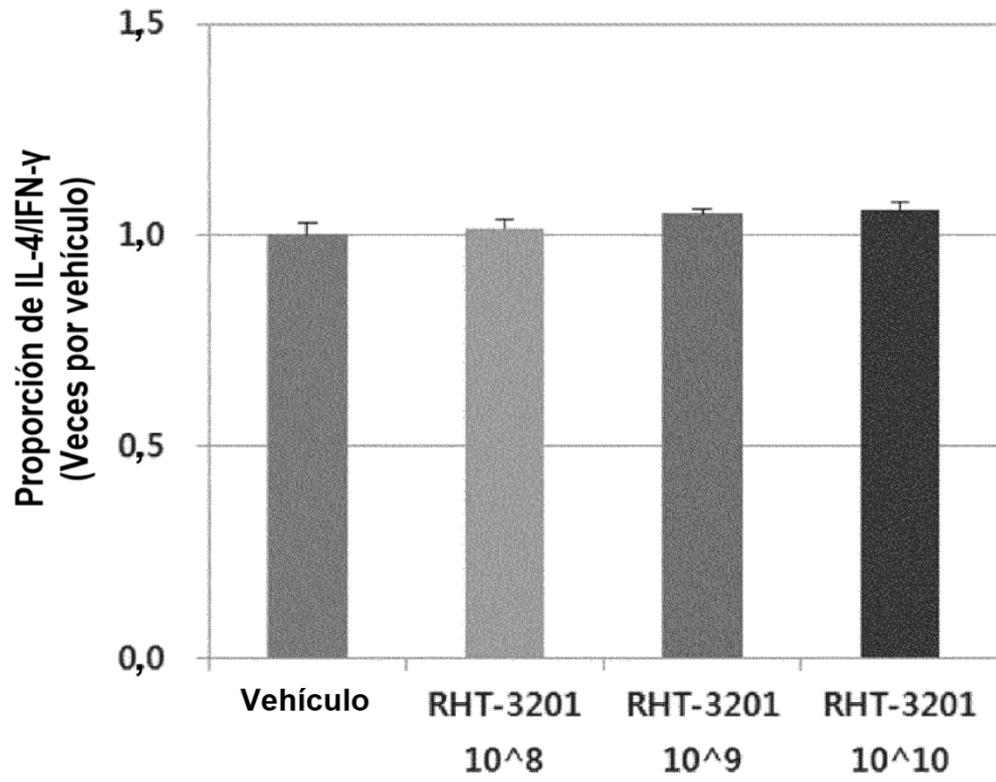
【 FIG 16】



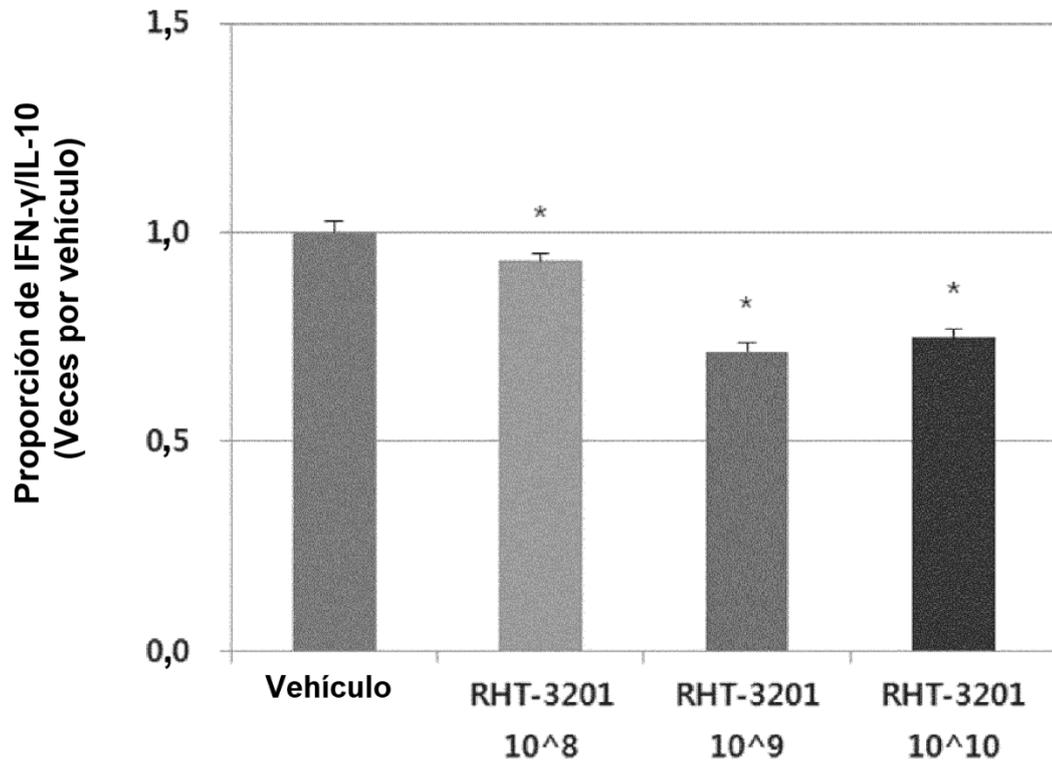
【 FIG 17】



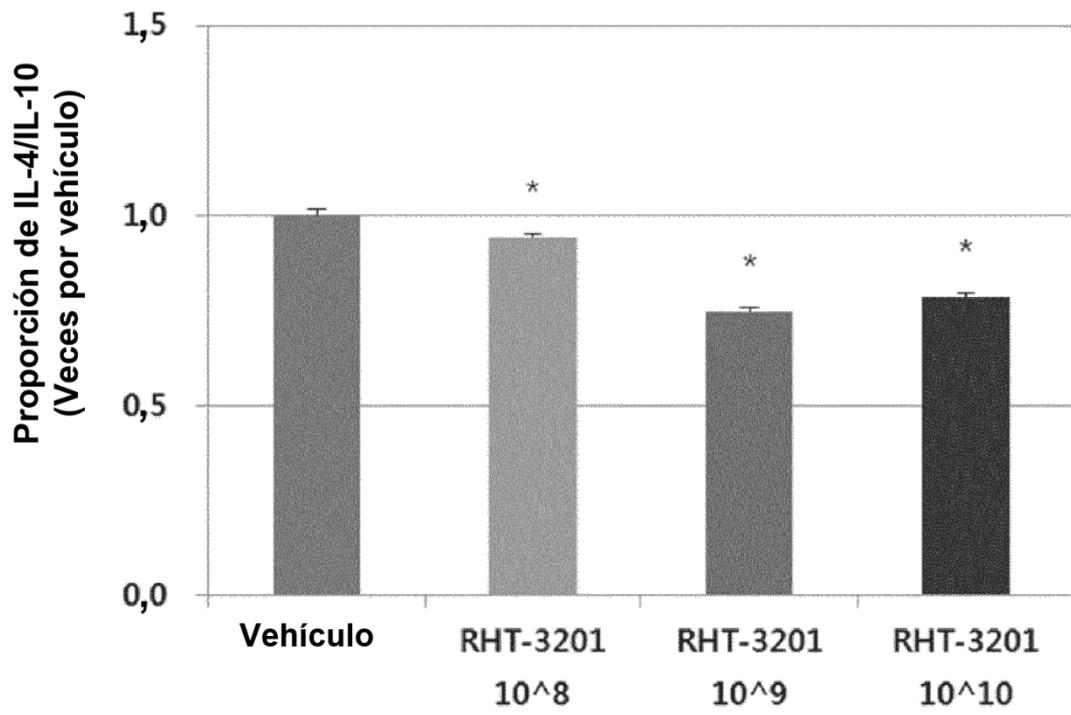
【 FIG 18】



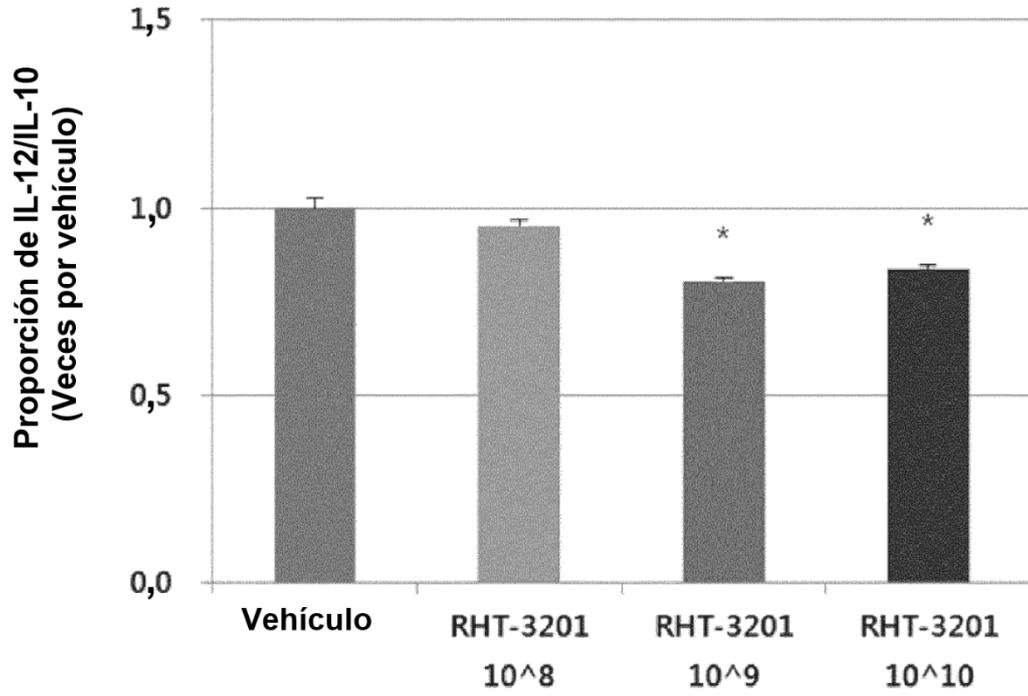
【 FIG 19】



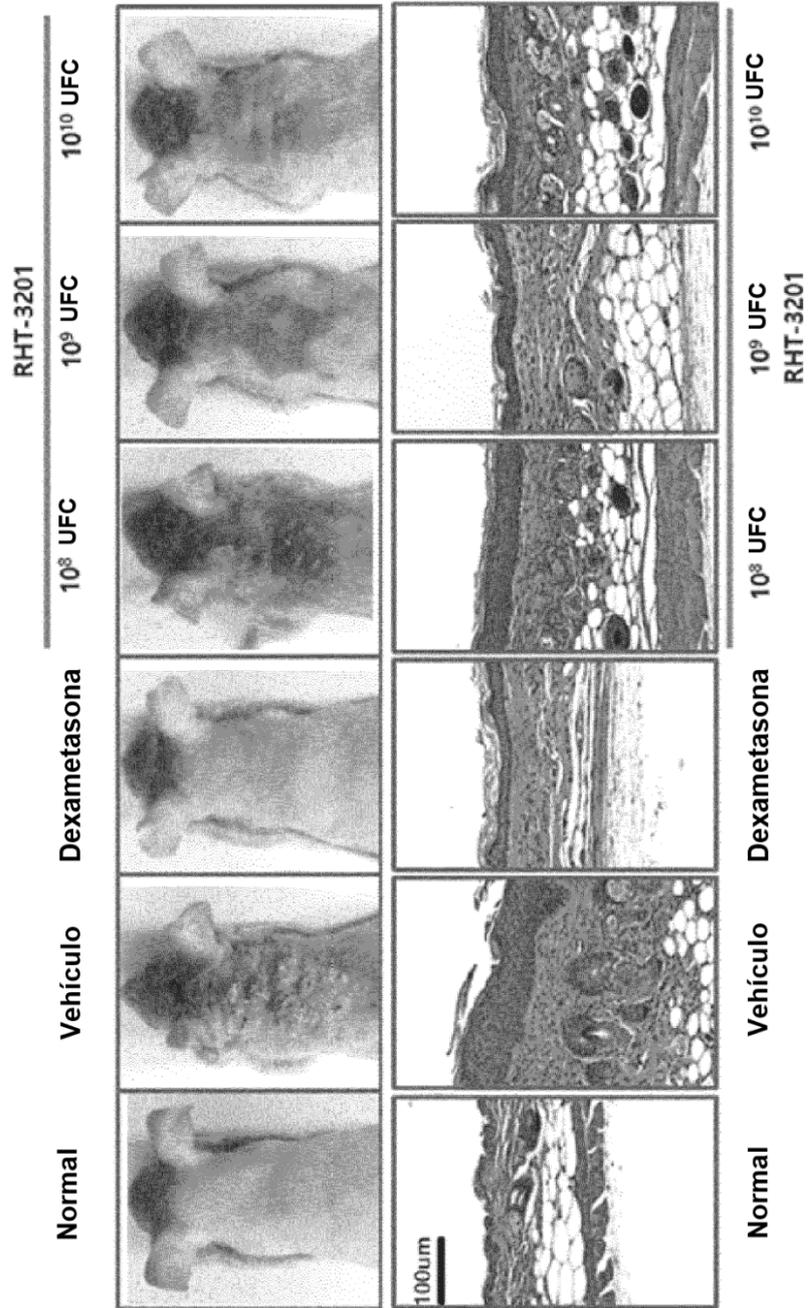
【 FIG 20】



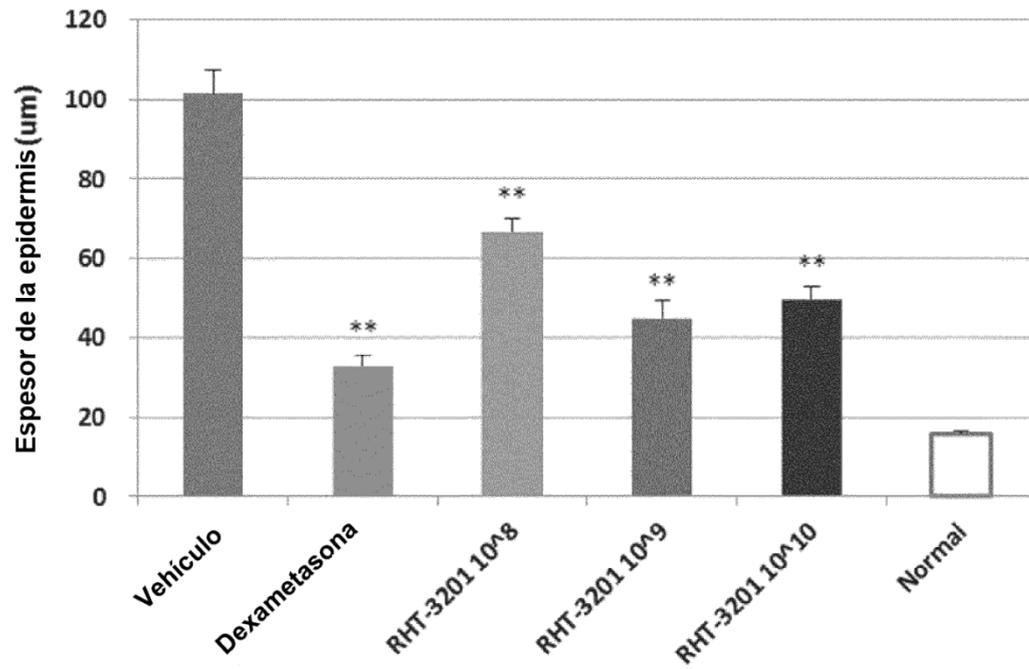
【 FIG 21】



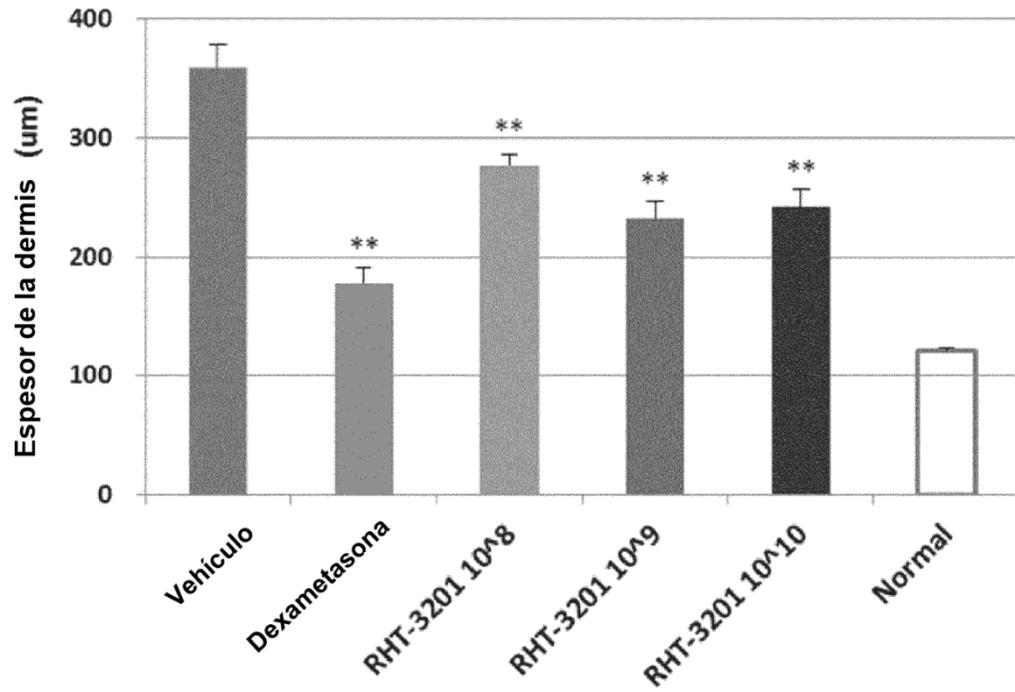
【 FIG 22】



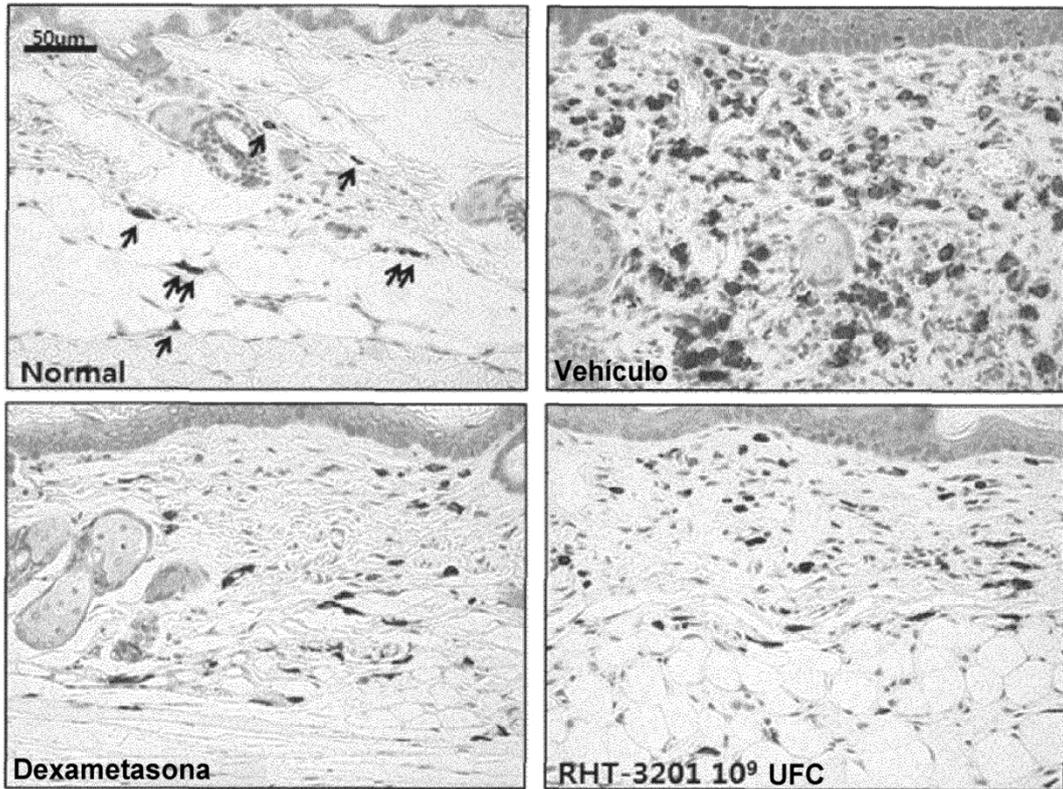
【 FIG 23】



【 FIG 24】



【 FIG 25】



【 FIG 26】

