

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 757**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23L 5/00 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2016** **PCT/JP2016/053378**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016** **WO16125861**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2016** **E 16746692 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** **EP 3255140**

54 Título: **Bacterias del ácido láctico, inmunoactivador natural y agente preventivo/terapéutico de infecciones derivado de dichas bacterias del ácido láctico, y alimento/bebida**

30 Prioridad:

06.02.2015 JP 2015022567

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2025

73 Titular/es:

GENOME PHARMACEUTICALS INSTITUTE CO., LTD. (33.33%)
Heim Ochanomizu 2F, D,3-4-5 Hongo, Bunkyo-ku Tokyo 113-0033, JP;
ANTENNA CO., LTD. (33.33%) y
THE UNIVERSITY OF TOKYO (33.33%)

72 Inventor/es:

SEKIMIZU, KAZUHISA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 757 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

Bacterias del ácido láctico, inmunoactivador natural y agente preventivo/terapéutico de infecciones derivado de dichas bacterias del ácido láctico, y alimento/bebida

Campo técnico

La presente invención se refiere a una novedosa bacteria del ácido láctico, a una bacteria muerta de la novedosa bacteria del ácido láctico, a la novedosa bacteria del ácido láctico para su uso como medicamento, y a un alimento y una bebida que las comprenden.

Antecedentes de la técnica

Las bacterias del ácido láctico se han usado tradicionalmente en alimentos fermentados, también se han usado en la fabricación de alimentos y bebidas, medicamentos, probióticos y similares. Las bacterias del ácido láctico tienen características tales como Gram-positivas, catalasa-negativas, no formadoras de esporas, inmóviles, y similares.

Lactobacillus paraplantarum (*L. paraplantarum*) está estrechamente relacionada con *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), y se ha sabido que *L. paraplantarum* y *L. plantarum* son bacterias del ácido láctico Gram-positivas no patógenas y son heterofermentativas (documento no de patente 6).

Además, se han secuenciado los genomas completos de algunas especies y subespecies de bacterias del ácido láctico (documentos no de patente 1 y 2), y se ha utilizado *L. plantarum* recombinante para presentar un antígeno específico a través de la epidermis de los intestinos y se ha observado recientemente como un agente viable para prevenir la infección para su administración oral (documentos no de patente 3 y 4).

Por otro lado, se ha sabido que, en un mecanismo de inmunidad innata, las células inmunitarias tales como macrófagos y células dendríticas responden a sustancias que activan la inmunidad innata derivadas de bacterias o virus para producir citocinas, estimulando de este modo la reacción inmunitaria posterior. El mecanismo de la inmunidad innata es un mecanismo para controlar la infección que tienen en común los organismos, es generalmente inespecífico, tiene una buena respuesta y funciona eficazmente contra muchas fuentes infecciosas.

En el pasado, el inventor ha desarrollado un método de evaluación (un método de cribado) que puede medir fácilmente una actividad para activar la inmunidad innata, usando gusanos de seda que tienen sólo un mecanismo de inmunidad innata (documento de patente 1 y documento no de patente 5). Además, el inventor ha demostrado que el método de evaluación puede evaluar o cribar un activador de la inmunidad innata que tiene actividad para activar la inmunidad innata contra vertebrados tales como seres humanos (documento de patente 1, etc.).

Además, los inventores han demostrado que los gusanos de seda son útiles como animales modelo para evaluar la tolerancia a la infección provocada por bacterias (documentos de patente 2, 3, etc.).

El documento de patente 4 da a conocer un cuerpo bacteriano triturado obtenido cultivando una bacteria Gram-negativa y triturando físicamente un cuerpo de la bacteria Gram-negativa, que comprende todos los componentes incluyendo componentes inmunoestimuladores en el cuerpo bacteriano, así como LPS que tienen pesos moleculares de 20.000 o menos como principios activos.

El documento de patente 5 da a conocer un método para producir un activador de la inmunidad innata derivado de la jalea real que tiene actividad de fomento de la inmunidad innata potenciada.

El documento de patente 6 da a conocer un agente de inmunopotenciación, una composición de inmunopotenciación, una composición de pienso y un método de inmunopotenciación, cada uno de los cuales tiene la capacidad de potenciar la inmunocompetencia de un cuerpo vivo.

El documento de patente 7 da a conocer *Lactobacillus plantarum* CJLP133 KCTC 11403BP, una composición para tratar enfermedades intestinales que comprende las bacterias del ácido láctico, y una composición para potenciar la inmunidad que comprende las bacterias del ácido láctico.

El documento de patente 8 da a conocer una *Lactobacillus* que tiene actividad de inmunoestimulación y/o actividad inhibidora de alergia y que también tiene resistencia al jugo gástrico.

La anomalía de un mecanismo inmunitario provoca diversas enfermedades. Por tanto, se ha deseado el desarrollo de un excelente activador de la inmunidad innata o agente para prevenir o tratar una infección que pueda ajustar un mecanismo inmunitario de este tipo. Además, también se ha deseado el desarrollo de un

alimento y una bebida que comprendan un material derivado de bacterias del ácido láctico o el agente anterior, y un alimento y una bebida que utilicen las bacterias del ácido láctico que tengan excelentes características.

Bibliografía de la técnica anterior

5

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO 2008/126905

10 Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2007-327964

Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2012-006917

Documento de patente 4: EP 2 722 386 A1

15

Documento de patente 5: WO 2012/108347 A1

Documento de patente 6: WO 2012/063345 A1

20 Documento de patente 7: WO 2011/010770 A1

Documento de patente 8: JP 2009 112 232 A

Documentos no de patente

25

Documento no de patente 1: Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Tarchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos WM, Siezen RJ. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci U S A. 18 de febrero de 2003;100(4):1990-5

30

Documento no de patente 2: Siezen RJ, Francke C, Renckens B, Boekhorst J, Wels M, Kleerebezem M, van Hijum SA. Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. J. Bacteriol. Enero de 2012;194(1):195-6.

35

Documento no de patente 3: Grangette C, Müller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. Infect Immun. Marzo de 2001;69(3):1547-53.

40

Documento no de patente 4: Seegers JF. *Lactobacilli* as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. Trends Biotechnol. Diciembre de 2002;20(12):508-15.

Documento no de patente 5: Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Sekimizu K. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. J Biol Chem. 25 de enero de 2008;283(4):2185-91.

45

Documento no de patente 6: Curk MC, Hubert JC, Bringel F. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. Int J Syst Bacteriol. Abril de 1996;46(2):595-8.

Sumario de la invención

50

Problemas que va a resolver la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una novedosa bacteria del ácido láctico que tenga una alta actividad para activar la inmunidad innata, un activador de la inmunidad innata que comprenda la bacteria del ácido láctico o una bacteria muerta o un material procesado de la bacteria del ácido láctico como principio activo, y un alimento y una bebida que comprendan la bacteria del ácido láctico o un activador de la inmunidad innata derivado de la bacteria del ácido láctico.

55

Además, el objeto de la misma es proporcionar un agente para prevenir o tratar una infección o un alimento y una bebida que comprendan un material derivado de una novedosa bacteria del ácido láctico como principio activo.

60

Medios para resolver los problemas

65 El presente inventor ha investigado seriamente para resolver los problemas anteriores y, como resultado, el inventor ha hallado que una bacteria del ácido láctico específica tiene una actividad más alta para activar la

inmunidad innata que la de las que se sabe que tienen una actividad para activar la inmunidad innata y la de otra bacteria del ácido láctico tal como una bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus*.

Además, el inventor ha hallado que la bacteria del ácido láctico que tiene una actividad para activar la inmunidad innata es una novedosa bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* (a continuación en el presente documento abreviada algunas veces como "#11-1"), a partir de los resultados del análisis de propiedades de la misma, el análisis de la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de la misma y similares.

Además, el inventor ha hallado inesperadamente que los gusanos de seda que ingieren fracción de peptidoglicano de la bacteria del ácido láctico tienen un tiempo de supervivencia más largo después de la infección con *Pseudomonas aeruginosa* y tienen tolerancia a la infección con *Pseudomonas aeruginosa*, aunque los gusanos de seda no tengan un mecanismo de inmunidad adquirida, mediante lo cual ha logrado la presente invención.

Es decir, la presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Efectos de la invención

Según la presente invención, puede proporcionarse una novedosa bacteria del ácido láctico que tiene una actividad significativamente alta para activar la inmunidad innata.

Además, la presente invención puede proporcionar un novedoso activador de la inmunidad innata que tiene una actividad significativamente alta para activar la inmunidad innata que comprende la novedosa bacteria del ácido láctico, una bacteria muerta de la bacteria del ácido láctico o un material procesado de la bacteria del ácido láctico como principio activo, y un alimento y una bebida que tienen una excelente actividad para activar la inmunidad innata que comprenden o se derivan de la bacteria del ácido láctico o del activador de la inmunidad innata.

Además, según la presente divulgación pero no reivindicado, puede proporcionarse un agente para prevenir o tratar una infección que comprende peptidoglicano de la novedosa bacteria del ácido láctico como principio activo, y la administración oral del agente para prevenir o tratar una infección puede prevenir una infección provocada por bacterias y similares. Por tanto, un alimento y una bebida que comprenden el agente para prevenir o tratar una infección son eficaces para la infección.

En un método de cribado que ha hallado una novedosa bacteria del ácido láctico o un novedoso activador de la inmunidad innata de la presente invención, se utiliza la contracción muscular del gusano de seda en respuesta a sustancias que activan la inmunidad innata, se suprime la detección de una actividad falsa-positiva para activar la inmunidad innata con LPS, y con mediciones que usan gusanos de seda, pueden obtenerse resultados de medición tomando ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) o PK (farmacocinética) de las muestras en consideración y pueden eliminarse compuestos que tienen toxicidad.

Por tanto, el activador de la inmunidad innata, el agente para prevenir o tratar una infección y el alimento y la bebida de la presente invención tienen un efecto excelente ya que han superado la prueba anterior.

La bacteria del ácido láctico de la presente invención puede utilizarse no sólo para fabricar alimentos y bebidas habituales, alimentos saludables, medicamentos, alimentos y bebidas fermentados, probióticos y similares, sino también para prevenir o tratar una enfermedad con activación de la inmunidad innata. Como alimento y bebida fermentados, es más preferible que la bacteria del ácido láctico se use en leche fermentada, bebida con bacterias del ácido láctico, yogur, encurtidos y un iniciador para fabricar encurtidos. Además, la bacteria del ácido láctico no sensible al ácido puede administrarse al intestino delgado sin descomponerse en el estómago.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

La figura 1 es un diagrama que muestra el resultado del análisis de homología de ADNr 16S de *Lactobacillus paraplantarum* #11-1 de la presente invención y ADNr 16S de *Lactobacillus paraplantarum* DSM10667 (NR-025447.1) que está estrechamente relacionada con la misma, usando BLAST.

Figura 2

La figura 2 es un diagrama de continuación a la figura 1.

Figura 3

La figura 3 (no es según la invención reivindicada) es un gráfico que muestra el tiempo de supervivencia después

de la infección con *P. aeruginosa* de gusanos de seda que ingieren fracción de peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* PGN y gusanos de seda que no ingieren la fracción.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

5 A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención, pero la presente invención no está limitada por las siguientes realizaciones específicas, y puede ponerse en práctica modificando opcionalmente las mismas.

10 Bacteria del ácido láctico

La presente invención es una bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* con número de registro NITE BP-02005 en el Depositario de Microorganismos de Patentes NITE (NPMD) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) de la Agencia Administrativa Incorporada.

15 La descripción detallada de la novedosa bacteria del ácido láctico (#11-1) perteneciente al género *Lactobacillus* es tal como sigue.

Morfología: #11-1 de la presente invención se aisló por primera vez a partir de encurtidos de salvado de arroz.

20 Situación de crecimiento en medio de cultivo:

(1) En medio GAM y medio de agar MRS, se forma una colonia blanca. No se encuentran pigmentos de colores difusores.

25 (2) En medio de agar MRS con carbonato de calcio, se forma una zona de transparencia con producción de ácido láctico.

Propiedades fisiológicas:

30 Las propiedades de clasificación fisiológica y química de #11-1 de la presente invención son las siguientes.

(1) Comportamiento al oxígeno: aerobiótico

35 (2) Catalasa: -

(3) Fosfatasa alcalina: -

(4) Esterasa: -

40 (5) Esterasa lipasa: -

(6) Lipasa: -

45 (7) Leucina arilamidasa: +

(8) Valina arilamidasa: +

(9) Cisteína arilamidasa: -

50 (10) Tripsina: -

(11) α -Quimotripsina: -

55 (12) Fosfatasa ácida: +

(13) Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa: +

(14) α -Galactosidasa: -

60 (15) β -Galactosidasa: -

(16) β -Glucuronidasa: -

65 (17) α -Glucosidasa: -

	(18) β -Glucosidasa: -
5	(19) N-acetil- β -glucosaminidasa: -
	(20) α -Manosidasa: -
	(21) α -Fucosidasa: -
10	(22) Capacidad de producción de ácido y gas a partir a partir de los siguientes azúcares y similares:
	Glicerol: -
15	Eritritol: -
	D-arabinosa: -
	L-arabinosa: -
20	D-ribosa: $\pm$
	D-xilosa: -
25	L-xilosa: -
	D-adonitol: -
	Metil- β -D-xilopiranosido: -
30	D-galactosa: +
	D-glucosa: +
35	D-fructosa: +
	D-manosa: +
	L-sorbosa: -
40	L-ramnosa: -
	Dulcitol: -
45	Inositol: -
	D-manitol: +
	D-sorbitol: -
50	Metil- α -D-manopiranosido: -
	Metil- α -D-glucopiranosido: +
55	N-acetilglucosamina: +
	Amigdalina: $\pm$
	Arbutina: +
60	Esculina: +
	Salicina: +
65	D-celobiosa: +

- D-maltosa: +
- D-lactosa: -
- 5 D-melibiosa: -
- D-sacarosa: +
- D-trehalosa: +
- 10 Insulina: -
- D-melezitosa: -
- 15 D-rafinosa:
- Almidón: -
- Glicógeno: -
- 20 Xilitol: -
- Gentiobiosa: +
- 25 D-turanosa: -
- D-lixosa: -
- D-tagatosa: -
- 30 D-fucosa: -
- L-fucosa: -
- 35 D-arabitol: -
- L-arabitol: -
- Gluconato: ±
- 40 2-Ceto-gluconato: -
- 5-Ceto-gluconato: -
- 45 Resultados del análisis biológico molecular:
- Los resultados del análisis de #11-1 con respecto a ADNr 16S según las pautas de la clasificación sistemática biológica molecular son los siguientes.
- 50 La secuencia de nucleótidos de la región de ADNr 16S del ADN genómico de #11-1 se amplificó por PCR y se analizó mediante un secuenciador; y, como resultado, se obtuvo una secuencia de nucleótidos de casi toda la longitud de ADNr 16S.
- 55 Cuando se realizó la búsqueda de homología de esta secuencia de nucleótidos usando análisis con BLAST de NCBI, la secuencia de nucleótidos de la región de ADNr 16S de #11-1 mostró el 98 % de homología con respecto a la secuencia de nucleótidos de la cepa DSM10667 de *Lactobacillus paraplantarum* (número de registro NR_025447.1), y #11-1 pertenece a *L. plantarum paraplantarum*.
- 60 Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de la región de ADNr 16S de #11-1 no corresponde completamente a la de la cepa DSM10667 de *Lactobacillus paraplantarum*, #11-1 de la presente invención es una cepa (subespecie) de bacterias del ácido láctico diferente de la cepa anterior.
- 65 Haciendo referencia las propiedades de clasificación fisiológica y química de #11-1 tal como se ha descrito anteriormente a la clasificación según Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 3 1989 y a la descripción en otras referencias, junto con los resultados del análisis de ADNr 16S, #11-1 de la presente invención es un novedoso microorganismo perteneciente al género *Lactobacillus*.

En comparación con las cepas conocidas pertenecientes al género *Lactobacillus*, #11-1 tiene la actividad más alta para activar la inmunidad innata, y se determinó exhaustivamente que #11-1 era una novedosa cepa de microorganismos aislada.

#11-1 fue depositada domésticamente el 5 de febrero de 2015 en el Depósito de Microorganismos de Patentes NITE (NPMD) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (a continuación en el presente documento abreviado como "NITE") de la Agencia Administrativa Incorporada, cuya dirección es sala 122, 2-5-8 Kazusakamatari Kisarazu-shi, Chiba, con el número de registro NITE P-02005.

Luego se transfirió #11-1 al depósito internacional (fecha de transferencia (fecha de depósito internacional): 28 de enero de 2016) desde el depósito doméstico (fecha de depósito original: 5 de febrero de 2015) solicitando convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest al Depositario de Microorganismos de Patentes NITE (NPMD) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) de la Agencia Administrativa Incorporada, cuya dirección es sala 122, 2-5-8 Kazusakamatari Kisarazu-shi, Chiba; como resultado de la declaración de viabilidad y la aceptación de la solicitud de transferencia, se le dio el número de registro "NITE BP-02005".

Al igual que las propiedades generales de una bacteria, las propiedades de la cepa de la misma tienden a mutarse fácilmente; y, por tanto, existe la posibilidad de que las propiedades fisiológicas de #11-1 no permanezcan tal como se ha mostrado anteriormente. Además, no es necesario decir que la "mutación" descrita anteriormente incluye tanto mutación natural como mutación artificial.

Un método para cultivar #11-1 es tal como sigue. El método para cultivar #11-1 puede ser uno según un método general para cultivar el género *Lactobacillus*.

Es preferible que el cultivo esté en condiciones anaerobias. En cuanto a la fuente de carbono en el medio de cultivo, pueden usarse compuestos de carbono orgánicos tales como D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, sacarosa, D-trehalosa, gentiobiosa, jarabe, jarabe de almidón, grasas y aceites, y en cuanto a la fuente de nitrógeno, pueden usarse compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos tales como extracto de carne, caseína, peptona, extracto de levadura, levadura seca, germen, soja en polvo, urea, aminoácido y sal de amonio.

Además, pueden añadirse sales inorgánicas tales como sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de fosfato, sal de hierro, sal de cobre, sal de zinc y sal de cobalto según sea necesario. Además, es preferible la adición de un acelerador del crecimiento tal como biotina, vitamina B1, cisteína, oleato de metilo y aceite de manteca de cerdo con el fin de aumentar la cantidad de producción de la sustancia prevista.

Además, puede añadirse un agente antiespumante tal como un aceite de silicona y un tensioactivo. En cuanto a un medio de cultivo preparado, por ejemplo, se usa preferiblemente medio MRS o medio GAM.

Tal como se ha descrito anteriormente, las condiciones de cultivo pueden ser según un método general para cultivar el género *Lactobacillus*. El cultivo estático es preferible como cultivo líquido. En el caso de cultivar la bacteria a pequeña escala, puede usarse cultivo estático usando una botella de vidrio con una tapa.

Es preferible mantener la temperatura de cultivo a de 25 a 37 °C, más preferiblemente a de 32 a 37 °C. En cuanto al pH durante el cultivo, es preferible alrededor de 7. El periodo de cultivo es variable dependiendo del factor tal como la composición de un medio de cultivo usado y la temperatura de cultivo, por ejemplo, en un caso de #11-1, el periodo de cultivo es preferiblemente de 12 a 72 horas y más preferiblemente de 24 a 48 horas, tiempo durante el cual puede garantizarse una cantidad suficiente de la sustancia prevista.

Es preferible que se recoja una colonia obtenida mediante cultivo para formar una única colonia en un medio de cultivo de nuevo.

Activador de la inmunidad innata

La novedosa bacteria del ácido láctico #11-1 según la presente invención es la bacteria del ácido láctico, en la que la bacteria del ácido láctico tiene una actividad para activar la inmunidad innata.

Es decir, la presente invención es una bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* con número de registro NITE BP-02005, en la que la bacteria del ácido láctico tiene una actividad para activar la inmunidad innata.

La medición de una actividad para activar la inmunidad innata se realizó usando un método descrito en detalle en el ejemplo, es decir, un método que utiliza la contracción muscular gradual de gusanos de seda descrito en detalle en Ishii K., Hamamoto H., Kamimura M., Sekimizu K., J. Biol. 25 de enero de 2008;283(4):2185-91).

Cualquiera de "#11-1 (según la presente invención) o una bacteria del ácido láctico mutada de manera artificial o natural de la misma (no es según la invención tal como se reivindica)", "una bacteria muerta de la bacteria del ácido láctico" (según la invención) y "un material procesado de la bacteria del ácido láctico" (no es según la invención tal como se reivindica) tiene una actividad para activar la inmunidad innata.

En cuanto al "material procesado de la bacteria del ácido láctico", los ejemplos son al menos uno de los materiales procesados seleccionados del grupo que consiste en material cultivado, material concentrado, material pastoso, material secado, material fluido, material diluido, material triturado, material esterilizado de la bacteria del ácido láctico y extracto del material cultivado. Ejemplos de "material secado" son material secado por pulverización, material secado por congelación, material secado al vacío, material secado en tambor.

Otro aspecto de la presente invención es un activador de la inmunidad innata que comprende "la bacteria del ácido láctico anterior de la presente invención (#11-1 (según la invención) o una bacteria del ácido láctico mutada de manera artificial o natural de la misma (no es según la invención tal como se reivindica)), una bacteria muerta de la bacteria del ácido láctico (según la invención) o un material procesado de la bacteria del ácido láctico (no es según la invención tal como se reivindica) como principio activo, en el que el material procesado de la bacteria del ácido láctico es al menos uno de los materiales procesados seleccionados del grupo que consiste en material cultivado, material concentrado, material pastoso, material secado, material fluido, material diluido, material triturado, material esterilizado de las bacterias del ácido láctico y extracto del material cultivado.

El activador de la inmunidad innata puede comprender la bacteria del ácido láctico de la presente invención, una bacteria muerta de la bacteria del ácido láctico o un material procesado de la bacteria del ácido láctico en diversos estados. Ejemplos de estados son una suspensión, una célula de bacteria del ácido láctico, un sobrenadante del medio, un componente del medio, y similares.

En cuanto a la bacteria del ácido láctico, puede usarse adecuadamente una bacteria viable, una bacteria húmeda, una bacteria secada y similares. Además, puede usarse la bacteria muerta sometida a esterilización tal como esterilización por calor, esterilización por irradiación, trituración y similares.

El contenido de bacterias del ácido láctico, bacterias muertas de las bacterias del ácido láctico o material procesado de las bacterias del ácido láctico, como principio activo, en el activador de la inmunidad innata no está particularmente restringido; y, por tanto, el contenido de los mismos puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de su propósito. Cuando la totalidad del activador de la inmunidad innata es de 100 partes en masa, "la cantidad total de bacterias del ácido láctico, bacterias muertas de las bacterias del ácido láctico o material procesado de las bacterias del ácido láctico" es preferiblemente de 0,001 a 100 partes en masa, más preferiblemente de 0,01 a 99 partes en masa, incluso más preferiblemente de 0,1 a 95 partes en masa, todavía más preferiblemente de 1 a 90 partes en masa.

El principio activo puede usarse solo o en combinación de dos o más. Cuando se combinan dos o más sustancias, una razón de contenido de los respectivos principios activos en el activador de la inmunidad innata no está particularmente limitada, y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito.

El activador de la inmunidad innata que comprende las bacterias del ácido láctico, bacterias muertas de las bacterias del ácido láctico o material procesado de las bacterias del ácido láctico también puede comprender "otro componente".

Los ejemplos del "otro componente" en el activador de la inmunidad innata, pero no se limitan a, pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito, y son un portador farmacéuticamente aceptable y similares.

El portador no está particularmente limitado y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la siguiente forma de dosificación. Además, el contenido del "otro componente" en el activador de la inmunidad innata no está particularmente limitado y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito.

Agente para prevenir o tratar una infección

La bacteria del ácido láctico de la presente invención, la bacteria muerta de la bacteria del ácido láctico o el material procesado de la bacteria del ácido láctico tienen una actividad para activar la inmunidad innata, son útiles como agente para prevenir o tratar una infección o agente para prevenir o tratar una infección para su administración oral.

El inventor demostró que la administración oral de peptidoglicano (no es según la invención tal como se reivindica) de bacterias del ácido láctico de la presente invención inducía la supervivencia extendida de gusanos de seda infectados con *P. aeruginosa*. Ya se ha demostrado que la tolerancia de los gusanos de seda infectados con bacterias está correlacionada con la tolerancia de mamíferos tales como seres humanos (por ejemplo,

documento de patente 2, 3, etc.).

Específicamente, se demostró que el peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* proporcionaba tolerancia a la infección con *P. aeruginosa* a los gusanos de seda.

Los gusanos de seda no tienen mecanismo de inmunidad adquirida, y no pueden producir anticuerpos contra antígenos. Por tanto, se pensó que el peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* administrado por vía oral activaba un mecanismo de inmunidad innata del intestino y similares del gusano de seda, y mostraba un efecto sobre el control de la infección.

Se ha sabido que en el caso de la administración oral de peptidoglicano de bacterias a animales, tales como ratones, que tienen un mecanismo de inmunidad adquirida, se le da inmunidad al animal.

Sin embargo, la presente invención demostró que el peptidoglicano de bacterias del ácido láctico (no es según la invención tal como se reivindica) proporcionaba tolerancia a la infección con *P. aeruginosa* a los gusanos de seda que tienen sólo un mecanismo de inmunidad innata, que no tienen un mecanismo de inmunidad adquirida. Se pensó que el peptidoglicano activaba un mecanismo de inmunidad innata de los gusanos de seda y los gusanos de seda tuvieron tolerancia a la infección, y se sugirió que un activador de la inmunidad innata que comprende bacterias del ácido láctico de la presente invención, bacterias muertas de las bacterias del ácido láctico o material procesado de las bacterias del ácido láctico (no es según la invención tal como se reivindica) puede usarse como agente para prevenir o tratar una infección en animales tales como mamíferos que tienen el mecanismo de inmunidad innata.

Un agente que comprende peptidoglicano de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus*, tal como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* y similares, como principio activo puede usarse como agente para prevenir o tratar una infección en mamíferos tales como seres humanos.

Por tanto, otro aspecto de la presente divulgación es un agente para prevenir o tratar una infección que comprende el activador de la inmunidad innata anterior como principio activo, o un agente para prevenir o tratar una infección que comprende peptidoglicano de las bacterias del ácido láctico anteriores (no es según la invención tal como se reivindica) como principio activo.

Medicamento; alimento y bebida; alimento saludable y similares

Las bacterias del ácido láctico de la presente invención o el activador de la inmunidad innata de la presente invención derivado de la bacteria del ácido láctico pueden mezclarse en medicamentos, productos para farmacéuticos, alimentos y bebidas que tienen estándares tales como alimentos y bebidas habituales, alimentos saludables y leche en polvo, y también pueden usarse en diversos medicamentos y alimentos y bebidas en cualquier forma.

El alimento y la bebida, especialmente leche fermentada, fabricados mediante un procedimiento de fermentación que usa las bacterias del ácido láctico de la presente invención son preferibles en cuanto a mostrar un efecto de las bacterias del ácido láctico o un efecto específico de la presente invención.

La forma de dosificación del activador de la inmunidad innata o agente para prevenir o tratar una infección de la presente invención no está particularmente limitada, y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del siguiente método de administración deseado.

Ejemplos de formas de dosificación son agentes sólidos orales (comprimidos, comprimidos recubiertos, gránulos, polvos, cápsulas duras, cápsulas blandas y similares), agentes líquidos orales (agentes líquidos para uso interno, agentes de jarabe, agentes de elixir y similares), agentes inyectables (soluciones, suspensiones y similares), pomadas, parches, agentes de gel, agentes de crema, polvos para uso externo, agentes de pulverización y polvos para inhalación.

Los agentes sólidos orales pueden producirse, por ejemplo, añadiendo un excipiente al principio activo, y además si es necesario añadiendo aditivos tales como un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un agente colorante y un agente aromatizante a los mismos, con un método convencional.

El excipiente incluye, por ejemplo, lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa cristalina fina y ácido silícico.

El aglutinante incluye, por ejemplo, agua, etanol, propanol, jarabe simple, una disolución de glucosa, una disolución de almidón, una disolución de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilalmidón, metilcelulosa, etilcelulosa, goma laca, fosfato de calcio y polivinilpirrolidona.

El disgregante incluye, por ejemplo, almidón seco, alginato de sodio, polvo de agar, hidrogenocarbonato de

sodio, carbonato de calcio, laurilsulfato de sodio, estearato de monoglicérido y lactosa.

El lubricante incluye, por ejemplo, talco purificado, sales de estearato, bórax y polietilenglicol.

- 5 El agente colorante incluye, por ejemplo, óxido de titanio y óxido de hierro.

El agente aromatizante incluye, por ejemplo, sacarosa, cáscara de naranja, ácido cítrico y ácido tartárico.

- 10 El agente líquido oral puede producirse, por ejemplo, añadiendo los aditivos, por ejemplo, el agente aromatizante, un tampón y un estabilizador, al principio activo, con el método convencional.

El agente aromatizante incluye, por ejemplo, sacarosa, cáscara de naranja, ácido cítrico y ácido tartárico. El tampón incluye, por ejemplo, citrato de sodio. El estabilizador incluye, por ejemplo, tragacanto, goma arábiga y gelatina.

- 15 Los agentes inyectables para inyecciones subcutáneas, intramusculares e intravenosas pueden producirse con el método convencional, por ejemplo, añadiendo un agente de ajuste del pH, el tampón, el estabilizador, un agente de tonicidad y un anestésico local al principio activo.

- 20 El agente de ajuste del pH y el tampón incluyen, por ejemplo, citrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio. El estabilizador incluye, por ejemplo, piro-sulfito de sodio, EDTA, ácido tioglicólico y ácido tioláctico. El agente de tonicidad incluye, por ejemplo, cloruro de sodio y glucosa. El anestésico local incluye, por ejemplo, clorhidrato de procaína y clorhidrato de lidocaína.

- 25 La pomada puede producirse combinando una base públicamente conocida, el estabilizador, un agente humectante y un conservante con el principio activo y mezclando los mismos, con el método convencional.

- 30 La base incluye, por ejemplo, parafina líquida, vaselina blanca, cera de abeja refinada, alcohol octildodecílico y parafina. El conservante incluye, por ejemplo, paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de etilo y paraoxibenzoato de propilo.

- 35 El parche puede producirse aplicando el agente de crema, el agente de gel o el agente de pasta como pomada sobre un soporte públicamente conocido, con el método convencional. El soporte incluye, por ejemplo, algodones, fibras cortadas, materiales tejidos y no tejidos compuestos por fibras químicas, películas de cloruro de vinilo blando, polietileno y poliuretano, y láminas de espuma.

- 40 El activador de la inmunidad innata de la presente invención o el agente para prevenir o tratar una infección puede usarse adecuadamente para individuos que requieren la activación de un mecanismo de inmunidad innata, individuos que quieren adquirir inmunidad adquirida contra bacterias.

Específicamente, por ejemplo, el agente puede usarse administrándolo a individuos que requieren mantenimiento de la salud y recuperación de la fatiga, individuos que requieren la prevención o el tratamiento de cánceres o enfermedades relacionadas con el estilo de vida, individuos infectados con bacterias, hongos o virus, y similares.

- 45 Los animales sometidos a la administración del activador de la inmunidad innata o agente para prevenir o tratar una infección de la presente invención no están particularmente limitados, pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito, e incluyen, por ejemplo, seres humanos; animales de experimentación tales como ratones y ratas; monos; caballos; animales domésticos tales como ganado vacuno, cerdos, cabras, pollos; mascotas tales como gatos y perros; y similares.

- 50 El método de administración del activador de la inmunidad innata no está particularmente limitado, puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la forma de dosificación del activador de la inmunidad innata, e incluye administración oral, administración intraperitoneal, inyección en la sangre e inyección en el intestino. La administración oral es preferible en cuanto a mostrar fácilmente el efecto.

- 55 Una dosificación del activador de la inmunidad innata o del agente para prevenir o tratar una infección no está particularmente limitada, puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad, el peso corporal y el grado de los efectos deseados en un individuo que va a recibir la administración y, por ejemplo, es preferiblemente de 1 mg a 30 g, más preferiblemente de 10 mg a 10 g e incluso más preferiblemente de 100 mg a 3 g como el principio activo al día para un adulto.

- 65 Además, un periodo de administración del activador de la inmunidad innata o del agente para prevenir o tratar una infección no está particularmente limitado, puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito y, por ejemplo, puede administrarse de manera preventiva o puede administrarse de manera terapéutica.

El contenido de las bacterias del ácido láctico, del activador de la inmunidad innata o del agente para prevenir o

tratar una infección, en alimentos y bebidas que comprenden las bacterias del ácido láctico de la presente invención, bacterias muertas o material procesado de las bacterias del ácido láctico (no es según la invención tal como se reivindica), el activador de la inmunidad innata o el agente para prevenir o tratar una infección (a continuación en el presente documento abreviado algunas veces como "alimento y bebida de la presente invención"), no está particularmente limitado, puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito y aspecto (clase) de la bebida y el alimento. Cuando la totalidad del alimento y la bebida es de 100 partes en masa, la cantidad total es preferiblemente de 0,001 a 100 partes en masa, más preferiblemente de 0,01 a 100 partes en masa, incluso más preferiblemente de 0,1 a 100 partes en masa.

En el alimento y la bebida, las bacterias del ácido láctico de la presente invención, las bacterias muertas o el material procesado de las bacterias del ácido láctico (no es según la invención tal como se reivindica), el activador de la inmunidad innata o el agente para prevenir o tratar una infección pueden usarse solos o en combinación de dos o más. Cuando se combinan dos o más sustancias, una razón de contenido de las respectivas sustancias en el alimento y la bebida no está particularmente limitada, y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito.

El alimento y la bebida de la presente invención tienen una actividad para activar la inmunidad innata y/o una actividad para prevenir o tratar una infección.

El alimento y la bebida de la presente invención que comprenden el activador de la inmunidad innata o el agente para prevenir o tratar una infección de la presente invención pueden comprender "otro componente".

El "otro componente" no está particularmente limitado, puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito dentro del intervalo en el que los efectos de la presente invención no se vean perjudicados, e incluye, por ejemplo, diversas materias primas alimentarias. Además, el contenido del "otro componente" no está particularmente limitado y puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito.

Las bacterias del ácido láctico de la presente invención pueden usarse para fabricar alimentos y bebidas habituales, alimentos saludables, medicamentos, alimentos y bebidas fermentados, probióticos y similares. En cuanto a los alimentos y las bebidas fermentados, las bacterias del ácido láctico se usan preferiblemente en leche fermentada, bebida con bacterias del ácido láctico, yogur, encurtidos e iniciadores de bacterias del ácido láctico para fabricar encurtidos.

Las clases de alimentos no están particularmente limitadas, pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo del propósito, e incluyen, por ejemplo, aperitivos dulces tales como jaleas, caramelos, chocolates, galletas y gominolas; bebidas con sabor tales como té verde, té negro, café y refrescos; productos lácteos tales como leche fermentada, yogures y helados; productos vegetales o frutales procesados tales como bebidas vegetales, bebidas frutales y mermeladas; alimentos líquidos tales como sopas; productos de cereales procesados tales como panes y fideos; diversos aderezos y similares. Son preferibles los productos lácteos tales como yogures y leche fermentada.

El método de fabricación del alimento no está particularmente limitado, y puede fabricarse apropiadamente dependiendo de, por ejemplo, el alimento puede fabricarse mediante el método de fabricación de diversos alimentos habituales.

El alimento puede fabricarse como agentes sólidos orales, por ejemplo, comprimido, gránulo y cápsula, y agentes líquidos orales, por ejemplo, agente líquido para uso interno y agente de jarabe. El método de fabricación del agente sólido oral y del agente líquido oral no está particularmente limitado, pueden fabricarse, por ejemplo, según el método de fabricación del agente sólido oral y del agente líquido oral de los medicamentos descritos anteriormente.

El alimento y la bebida de la presente invención son especialmente útiles como alimento funcional, alimento saludable y similares con el propósito de activar un mecanismo de inmunidad innata o adquirir tolerancia a la infección.

En un caso en el que se usan bacterias del ácido láctico de la presente invención, bacterias muertas o material procesado de las mismas (no es según la invención tal como se reivindica) en la fabricación de alimentos y bebidas, puede usarse el método de fabricación conocido por un experto en la técnica. El experto en la técnica puede fabricar el alimento y la bebida previstos mediante una combinación apropiada de un procedimiento de mezclado de bacterias del ácido láctico viables o muertas o material procesado de bacterias del ácido láctico (no es según la invención tal como se reivindica) de la presente invención con otros componentes, un procedimiento de formación, un procedimiento de esterilización, un procedimiento de fermentación, un procedimiento de calentamiento, un procedimiento de secado, un procedimiento de enfriamiento, una etapa de granulación, una etapa de envasado y similares.

Además, cuando se fabrican diversas leches fermentadas usando bacterias del ácido láctico de la presente

invención, la leche fermentada puede fabricarse usando un método conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos incluyen alimentos y bebidas fabricados usando un procedimiento de adición de una cantidad requerida de bacterias del ácido láctico de la presente invención, como bacterias muertas, a la leche fermentada, y alimentos y bebidas fabricados usando un procedimiento de realización de fermentación usando bacterias del ácido láctico de la presente invención como iniciadores de bacterias del ácido láctico.

Cuando se realiza la fermentación usando bacterias del ácido láctico de la presente invención como iniciadores de bacterias del ácido láctico, las condiciones de cultivo pueden ser similares a las condiciones de cultivo de las bacterias del ácido láctico de la presente invención.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se explicará más específicamente mostrando ejemplos; pero la presente invención no se limita a los mismos a menos que se encuentren más allá de su alcance.

Materiales

Medio y condiciones de cultivo

El medio GAM y el medio de agar MRS se adquirieron respectivamente de Nissui y BD (Becton Dickinson). Se añadió carbonato de calcio (CaCO_3) según fuera necesario.

Se usó AnaeroPak (marca registrada) (Mitsubishi gas chemicals) para el cultivo anaerobio.

Aislamiento de bacterias del ácido láctico

Se usaron encurtidos de salvado de arroz como alimento fermentado. Se extendió en medio MRS el líquido suspendido en solución salina (NaCl al 0,9 % en masa) y se cultivó de manera anaerobia a 37 °C durante 2 días.

Se recogieron las colonias y volvieron a sembrarse en estrías en medio MRS con CaCO_3 para formar una única colonia.

Se obtuvo el resultado de las mediciones de una actividad para activar la inmunidad innata usando el siguiente método, una cepa de bacterias del ácido láctico (#11-1) con una excelente actividad para activar la inmunidad innata. Es decir, se aisló una cepa de bacterias del ácido láctico (#11-1).

La fermentación de ácido láctico se obtuvo con la formación de colonias blancas en medio MRS con CaCO_3 y la formación de banda transparente, y se confirmó que #11-1 eran bacterias del ácido láctico. También se confirmó que las colonias están teñidas para Gram y #11-1 era Gram-positiva.

Identificación de bacterias del ácido láctico

Se obtuvieron fragmentos de ADNr 16S mediante PCR de colonias usando la enzima KOD FX Neo para PCR (Toyobo), cebadores 9F y 1541R.

Las secuencias se determinaron con secuenciación directa usando el kit de secuenciación de ciclo BigDye (marca registrada) Terminator v3.1 y el analizador genético ABI PRISM (marca registrada) 3100.

La información sobre la secuencia se analizó a partir de la base de datos de secuencias de ARN ribosómico 16S (bacterias y arqueas, 7.545 secuencias), usando NCBI BLASTN 2.2.27+ (8).

La secuencia de nucleótidos de la región de ADNr 16S de #11-1 se muestra en SEQ ID NO: 1 en la lista de secuencias.

Se determinó la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S, se analizó la homología de la secuencia de nucleótidos mediante análisis con BLAST, y la secuencia de nucleótidos tenía una alta homología con una bacteria del ácido láctico tal como se muestra en las figuras 1 y 2.

Tal como se muestra en las figuras 1 y 2, esta secuencia de nucleótidos estaba estrechamente relacionada con una cepa DSM10667 de *L. paraplantarum* (secuencia de nucleótidos: NR_025447.1), pero no correspondían completamente entre sí, y #11-1 era una novedosa "*L. paraplantarum*".

Depósito

Tal como se ha descrito anteriormente, "#11-1" de la presente invención usada en los ejemplos se aisló a partir

de encurtidos de salvado de arroz, y se depositó domésticamente el 5 de febrero de 2015, como una bacteria del ácido láctico #11-1 perteneciente al género *Lactobacillus*, en el Depositario de Microorganismos de Patentes NITE (NPMD) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) de la Agencia Administrativa Incorporada, autorizada como institución depositaria según las regulaciones de la Ley de Patentes y la autoridad depositaria internacional según el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos en materia de patentes, cuya dirección es sala 122, 2-5-8 Kazusakamataru Kisarazu-shi, Chiba, con número de registro NITE P-02005.

Luego se transfirió #11-1 al depósito internacional (fecha de transferencia (fecha de depósito internacional): 28 de enero de 2016) desde el depósito doméstico (fecha de depósito original: 5 de febrero de 2015) solicitando convertir el depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest al Depositario de Microorganismos de Patentes NITE (NPMD) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) de la Agencia Administrativa Incorporada, cuya dirección es sala 122, 2-5-8 Kazusakamataru Kisarazu-shi, Chiba; como resultado de la declaración de viabilidad y la aceptación de la solicitud de transferencia, se le dio el número de registro "NITE BP-02005".

Ejemplo 1

Medición de la actividad para activar la inmunidad innata

La cepa #11-1 de *Lactobacillus paraplantarum* (#11-1 de *L. paraplantarum*) cultivada en medio MRS durante la noche se sometió a esterilización a 121 °C durante 20 minutos, y se inyectaron 50 µl de la cepa esterilizada en la muestra de músculo sin cabeza de gusano de seda en quinto estadio, y se midió una actividad para activar la inmunidad innata con contracción muscular gradual.

La medición de una actividad para activar la inmunidad innata con contracción muscular gradual se realizó según un método descrito en Ishii K., Hamamoto H., Kamimura M., Sekimizu K., J. Biol. 25 de enero de 2008;283(4):2185-91.

Es decir, se inyectaron respectivamente 0,05 ml de muestras cuyas concentraciones de sustancia que iban a medirse eran múltiples etapas en la sangre de la muestra de músculo sin cabeza de gusano de seda en quinto estadio, y se midió la longitud corporal cuando la longitud contraída era máxima (aproximadamente diez minutos después).

Se obtuvo el "valor C (valor de contracción)" restando la longitud corporal después de la inyección de la longitud corporal antes de la inyección, y dividiendo el valor restado entre la longitud corporal antes de la inyección, [(longitud corporal antes de la inyección)-(longitud corporal después de la inyección)]/(longitud corporal antes de la inyección), y el valor C de 0,15 se definió como 1 U (unidad).

El valor C se midió con la dilución obtenida diluyendo las muestras con solución salina al 0,9 % hasta 1, 4, 16, 64, 256 veces respectivamente, se calculó la "masa de sustancia que va a medirse administrada al gusano de seda" proporcionando 1 U (valor C = 0,15) a partir de un gráfico en el que el eje X indicaba la concentración de sustancia que va a medirse y el eje Y indicaba el valor C y se calcularon las unidades (U) por unidad de masa, evaluándose así una actividad para activar la inmunidad innata de la sustancia que va a medirse.

Además, se midieron 0,05 ml de solución salina como control negativo (tolerancia del valor C de 0,05 o menos), 0,2 ml de aire como control positivo (tolerancia del valor C de 0,2 a 0,4).

Ejemplos comparativos 1 a 3

Con la excepción de usar bacterias Gram-positivas #4, #11-2 y A mostradas en la tabla 1 en lugar de la cepa #11-1 de *Lactobacillus paraplantarum* (#11-1 de *L. paraplantarum*) en el ejemplo 1, se midió una actividad para activar la inmunidad innata con contracción muscular de gusanos de seda de la misma manera que en el ejemplo 1.

La siguiente tabla 1 muestra el origen y las propiedades del ejemplo 1 y los ejemplos comparativos 1 a 3. Como referencia, la cepa estrechamente relacionada y la homología de la cepa se muestran en la tabla 1.

La siguiente tabla 2 muestra el resultado de la medición de una actividad para activar la inmunidad innata.

Tabla 1

N.º	Cepa	Origen	Tinción para	Referencia
-----	------	--------	--------------	------------

			Gram	Línea superior: Cepa estrechamente relacionada Línea inferior: Número de registro	homología (%)
Ejemplo 1	#11-1	Encurtidos de salvado de arroz	Bacilos Gram-positivos	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 NR_075041.1	99
Ejemplo comparativo 1	#4	Encurtidos de salvado de arroz	Bacilos Gram-positivos	<i>Lactobacillus sakei</i> 23K NR_075042.1	99
Ejemplo comparativo 2	#11-2	Encurtidos de salvado de arroz	Cocos Gram-positivos	<i>Pediococcus ethanolidurans</i> Z-9 NR_043291.1	98
Ejemplo comparativo 3	A	Kimchi	Cocos Gram-positivos	<i>Leuconostoc citreum</i> KM20 NR_074694.1	100

Tabla 2

N.º	Cepa	Tinción para Gram	Actividad (U/mg)
Ejemplo 1	#11-1	Bacilos Gram-positivos	165±35 (n=2)
Ejemplo comparativo 1	#4	Bacilos Gram-positivos	6,7
Ejemplo comparativo 2	#11-2	Cocos Gram-positivos	2,7
Ejemplo comparativo 3	A	Cocos Gram-positivos	43

- 5 Como resultado de las mediciones de una actividad para activar la inmunidad innata de las bacterias del ácido láctico de la presente invención, tal como se muestra en la tabla 2, la actividad de *L. paraplantarum* #11-1 del ejemplo 1 fue de 165 U/mg y #11-1 tuvo una actividad significativamente alta para activar la inmunidad innata.

- 10 Además, tal como se muestra en la tabla 2, con la comparación de los resultados de la medición de "una actividad para activar la inmunidad innata (U/mg)" del ejemplo 1 y los ejemplos comparativos 1 y 2, *L. paraplantarum* #11-1 de la presente invención mostró una actividad mucho mayor para activar la inmunidad innata, en comparación con otras cepas obtenidas a partir de encurtidos de salvado de arroz.

- 15 Además, una actividad para activar la inmunidad innata de *Leuconostoc citreum* KM20, conocidas como "bacterias del ácido láctico vegetales" fue de 43 U/mg y menor que la de *L. paraplantarum* #11-1 de la presente invención (ejemplo comparativo 3).

Ejemplo comparativo 4

- 20 Con la excepción de usar la cepa OLL1073 de *Lactobacillus bulgaricus* en lugar de la cepa #11-1 de *L. paraplantarum* en el ejemplo 1, se midió una actividad para activar la inmunidad innata de la misma manera que en el ejemplo 1.

Ejemplo comparativo 5

- 25 Con la excepción de usar la cepa YIT9029 de *Lactobacillus casei* en lugar de la cepa #11-1 de *L. paraplantarum* en el ejemplo 1, se midió una actividad para activar la inmunidad innata de la misma manera que en el ejemplo 1.

Ejemplo comparativo 6

- 30 Con la excepción de usar la cepa JCM5805 de *Lactococcus lactis* en lugar de la cepa #11-1 de *L. paraplantarum* en el ejemplo 1, se midió una actividad para activar la inmunidad innata de la misma manera que en el ejemplo 1.

Los resultados de los ejemplos comparativos 4 a 6 se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

N.º	Cepa	Actividad (U/mg)
Ejemplo comparativo 4	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	24
Ejemplo comparativo 5	<i>Lactobacillus casei</i>	5,6
Ejemplo comparativo 6	<i>Lactococcus lactis</i>	17

Las bacterias del ácido láctico de los ejemplos comparativos 4 a 6 son bacterias del ácido láctico que se usan actualmente en la fabricación de leche fermentada comercial.

Tal como se muestra en la tabla 3, las bacterias del ácido láctico #11-1 de la presente invención del ejemplo 1 tenían una actividad más alta para activar la inmunidad innata, en comparación con las bacterias del ácido láctico de los ejemplos comparativos 4 a 6.

Cuando se midió el material esterilizado de *Lactobacillus paraplantarum* #11-1 de la presente invención, la actividad para activar la inmunidad innata fue significativamente alta, y se halló que las bacterias del ácido láctico de la presente invención, las bacterias muertas de las bacterias del ácido láctico de la presente invención o el material procesado de las bacterias del ácido láctico de la presente invención (por ejemplo, material cultivado, material concentrado, material pastoso, material secado tal como material secado por pulverización, material secado por congelación, material secado al vacío y material secado en tambor, material fluido, material diluido, material triturado, material esterilizado de las bacterias del ácido láctico y extracto del material cultivado) eran altamente adecuados como activador de la inmunidad innata.

Además, ya se ha sabido que *Lactobacillus paraplantarum* tiene seguridad como alimento fermentado.

El alimento y la bebida obtenidos fermentando leche usando *L. paraplantarum* #11-1 de la presente invención tienen una actividad para activar la inmunidad innata.

Ejemplo 2 (no es según la invención tal como se reivindica)

Prueba para el efecto contra la infección bacteriana

Se preparó la fracción de peptidoglicano de "*Lactobacillus plantarum* subesp. *plantarum* JCM 1057" (a continuación en el presente documento abreviada como "*L. plantarum* PGN", también en la figura 3) perteneciente a *Lactobacillus plantarum*, obtenida de RIKEN, según un método habitual, se mezcló el 2,7 % en masa de la fracción de peptidoglicano con una dieta artificial de gusanos de seda, y la dieta mixta se administró a gusanos de seda durante 2 días. Es decir, se administraron 0,041 g en total antes de la inyección.

Luego, tal como se describe a continuación, se investigó el efecto del peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* sobre la infección con *P. aeruginosa*.

Se cultivó *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) a 30 °C durante la noche. El líquido bacteriano se diluyó con solución salina hasta 1000 veces, y se inyectaron 50 µl de la dilución en el líquido corporal del gusano de seda.

Después de la inyección, se detuvo la alimentación de peptidoglicano al gusano de seda, se dejó crecer al gusano de seda a 27 °C, y se contó la supervivencia de los gusanos de seda con el tiempo.

Tal como se muestra en la figura 3, los gusanos de seda que ingerían la fracción de peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* tenían un tiempo de supervivencia más largo después de la infección con *P. aeruginosa* en comparación con los gusanos de seda que no ingerían la fracción de peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum*.

Con la fracción de peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum*, se proporcionó tolerancia a la infección con *P. aeruginosa* a los gusanos de seda.

Se pensó que el peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* administrado por vía oral activaba un mecanismo de inmunidad innata del intestino del gusano de seda, y mostraba efecto sobre el control de la infección.

Se halló que un agente que comprende peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* como principio activo era útil como agente para prevenir o tratar una infección en mamíferos tales como seres humanos.

Además, se ha sabido que los alimentos fermentados con *Lactobacillus plantarum* tienen seguridad. Por tanto, el

agente para prevenir o tratar una infección que comprende peptidoglicano de *Lactobacillus plantarum* como principio activo es útil como alimento y bebida para mamíferos tales como seres humanos.

Ejemplo 3

5

Fabricación de activador de la inmunidad innata y agente para prevenir o tratar una infección

Comprimido

- 10 El medio de cultivo de #11-1 se somete a esterilización a 121 °C durante 20 minutos. Después de mezclar uniformemente 20,0 mg del medio de cultivo concentrado de #11-1, 40 mg de lactosa, 20 mg de almidón y 5 mg de hidroxipropilcelulosa con bajo grado de sustitución, se prepararon gránulos para comprimidos mediante un método de granulación en húmedo usando el 8 % en masa de disolución acuosa de hidroxipropilcelulosa como material aglutinante. A esto se le añadieron de 0,5 a 1 mg de estearato de magnesio, cantidad necesaria para
- 15 proporcionar propiedades deslizantes a los gránulos, y luego se comprimieron mediante una máquina de formación de comprimidos.

Disolución

- 20 La disolución para inyección se preparó disolviendo 10,0 mg del medio de cultivo concentrado de #11-1 anterior, el 2 % en masa de disolución acuosa de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Aplicabilidad industrial

- 25 La novedosa bacteria del ácido láctico de la presente invención o el material procesado de la misma tiene una alta actividad para activar la inmunidad innata y un efecto para prevenir o tratar una infección. Por tanto, pueden proporcionarse un medicamento o un alimento y una bebida que comprenden un activador de la inmunidad innata que activa la inmunidad innata o un agente para prevenir o tratar una infección que utiliza la bacteria del ácido láctico de la presente invención, y están ampliamente disponibles en la industria farmacéutica, la industria
- 30 alimentaria, etc.

La presente solicitud se basa en la solicitud de patente japonesa n.º 2015-022567 presentada el 6 de febrero de 2015.

- 35 Número de registro

NITE BP-02005

Texto libre del diagrama de secuencias

40

SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias muestra la secuencia de nucleótidos de casi toda la longitud de ARNr 16S de la cepa desconocida perteneciente al género *Lactobacillus*.

REIVINDICACIONES

1. Bacteria del ácido láctico perteneciente al género *Lactobacillus* con número de registro NITE BP-02005 en el
5 Depositorio de Microorganismos de Patentes NITE (NPMD) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación
(NITE) de la Agencia Administrativa Incorporada.
2. Bacteria del ácido láctico según la reivindicación 1, en la que la bacteria del ácido láctico tiene la secuencia de
nucleótidos de la región de ADNr 16S mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Bacteria muerta de la bacteria del ácido láctico según la reivindicación 1 ó 2.
4. Alimento y bebida que comprenden la bacteria del ácido láctico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Bacteria del ácido láctico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento.
- 15 6. Bacteria del ácido láctico para su uso según la reivindicación 5 comprendida en un alimento o una bebida.

[FIG. 1]

Lactobacillus paraplantarum, cepa DSM 10667, gen de ARN ribosómico 16S, secuencia parcial

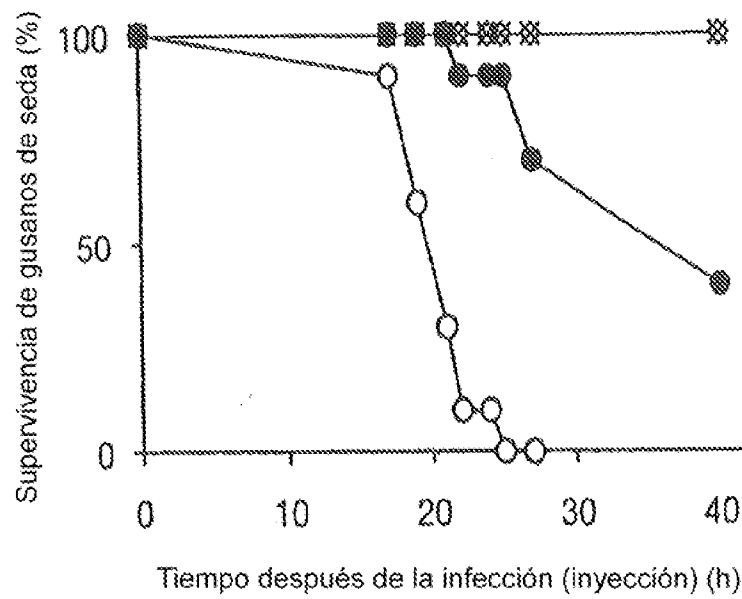
ID de secuencia: **refseq_028447.1** Longitud: **1502** Número de coincidencias: 1
Intervalo 1. de 31 a 1497

Puntuación	Esperado	Identicidades	Huecos	Cadena	Marco
2580 bits(1802)	0.0()	1452/1475(98%)	9/1475(0%)	Positiva/Positiva	
Características					
Consulta	7	TGCAGCTCGAACAACTCTCTGTTAAATTAATTAAGGTGCTTGCACCTGATTGTTTAAACAT			
Objetivo	31	TGCAGCTCGAACAACTCTCTGTTAAATTAATTAAGGTGCTTGCACCTGATTGTTTAAACAT			
Consulta	67	TTGACTGAGTCGCCAACTGCTGAGTAACACCTGCGCAAACTTCCCAACAGCTGGGGATAA			
Objetivo	81	TTGACTGAGTCGCCAACTGCTGAGTAACACCTGCGCAAACTTCCCAACAGCTGGGGATAA			
Consulta	127	CACCTCGAAACAGATGCTTAATACCCCATACAACTCCGACCCCATGCTCTGAGTTTAAAA			
Objetivo	143	CACCTCGAAACAGATGCTTAATACCCCATACAACTCCGACCCCATGCTCTGAGTTTAAAA			
Consulta	187	GATGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGCTGCCCGCGGTATTAGCTAGATGCTGAGGTAA			
Objetivo	203	GATGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGCTGCCCGCGGTATTAGCTAGATGCTGAGGTAA			
Consulta	247	CCGCTCACCATGCAATGATACCTACCCGACCTGAGAGGCTAATCCGCCACATTGGCACT			
Objetivo	263	CCGCTCACCATGCAATGATACCTACCCGACCTGAGAGGCTAATCCGCCACATTGGCACT			
Consulta	307	GAGACACGCCCCAACTCTCTACCGGAGGCAACAGTACCGGAATCTCCACAAATGACCGAA			
Objetivo	323	GAGACACGCCCCAACTCTCTACCGGAGGCAACAGTACCGGAATCTCCACAAATGACCGAA			
Consulta	367	GTCTGATGAGCAACGCGCGGTGATGAGAGAGGCTTTCCGCTCGTAAAACTCTCTTGT			
Objetivo	383	GTCTGATGAGCAACGCGCGGTGATGAGAGAGGCTTTCCGCTCGTAAAACTCTCTTGT			
Consulta	427	AAAGAACAACATATCTGAGACTAACGTTTCAGGTATTGACGCTATTTAACCAAAAGCCA			
Objetivo	443	AAAGAACAACATATCTGAGACTAACGTTTCAGGTATTGACGCTATTTAACCAAAAGCCA			
Consulta	487	CCGCTAACTACGTCGCCAGCAGCGCGGTAAATACGTAGCTGGCAAGCGTTATCCCGATT			
Objetivo	503	CCGCTAACTACGTCGCCAGCAGCGCGGTAAATACGTAGCTGGCAAGCGTTATCCCGATT			
Consulta	547	TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTTCGGCTCAAC			
Objetivo	563	TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTTCGGCTCAAC			
Consulta	607	CGAAGAAGTGCATCGCAAACTTGCAGAACTTGAGTGCAGAAAGCACAGTGCAGCTCCATG			
Objetivo	623	CGAAGAAGTGCATCGCAAACTTGCAGAACTTGAGTGCAGAAAGCACAGTGCAGCTCCATG			
Consulta	667	TGTAGCGGTGAAATGCTAGATATATGAGAAACACCACTGCGCAAGCGGCTGCTGCT			
Objetivo	683	TGTAGCGGTGAAATGCTAGATATATGAGAAACACCACTGCGCAAGCGGCTGCTGCT			
Consulta	727	CTGTAACTGACCTGAGGCTCGAAAGTATGAGTACCAACAGGATTAGATACCCCTGCTAG			
Objetivo	743	CTGTAACTGACCTGAGGCTCGAAAGTATGAGTACCAACAGGATTAGATACCCCTGCTAG			
Consulta	787	TCCATACCCTAAACGATGAATGCTAAAGTGTGAGCGCTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGC			
Objetivo	803	TCCATACCCTAAACGATGAATGCTAAAGTGTGAGCGCTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGC			
Consulta	847	TAACGCATTAAACGATTCCGCCCTGGGCACTACCGCCCAAGGCTGAACTCAAAGCAATTG			
Objetivo	863	TAACGCATTAAACGATTCCGCCCTGGGCACTACCGCCCAAGGCTGAACTCAAAGCAATTG			
Consulta	907	ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGAGGATGTGCTTAAATTCGAAGCTACCGCAAGAACCTT			
Objetivo	923	ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGAGGATGTGCTTAAATTCGAAGCTACCGCAAGAACCTT			
Consulta	967	ACCAGGCTTTGACATACTATGCTAAATCTAAGGATTAACGCTTCCCTTCGGGACATGGA			
Objetivo	983	ACCAGGCTTTGACATACTATGCTAAATCTAAGGATTAACGCTTCCCTTCGGGACATGGA			
Consulta	1027	TACAGGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT			
Objetivo	1043	TACAGGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT			
Consulta	1087	CGAGCGCAACCCCTTATTATTAGTTGCCAGCAATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCG			

[FIG. 2]

Objetivo	1181	CCACCGCAACCCCTTATTATCAGTTCCACGATTAAAGTTCCGCACTCTGCTGAGACTGCCG	1182
Consulta	1147	CTCACAAACCGGAGCAAGCTGGGCATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC	1206
Objetivo	1163	CTGACAAACCGGAGCAAGCTGGGCATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC	1222
Consulta	1207	TACACACGTCCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCCGAACTCGCCGAGAGTAAGCTAATCT	1266
Objetivo	1223	TACACACGTCCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCCGAACTCGCCGAGAGTAAGCTAATCT	1282
Consulta	1267	CCTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGCAATCG	1326
Objetivo	1283	CCTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGCAATCG	1342
Consulta	1327	CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCC	1386
Objetivo	1343	CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCC	1402
Consulta	1387	CCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGTAACTTTCGGCG-ACCAGC	1445
Objetivo	1403	CCTCACACCATGAGACTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGTAACTTTCGGCG-ACCAGC	1462
Consulta	1446	CCGCTAAGCTGGGACAGATGATTACGGGGAAGTCC	1486
Objetivo	1463	CCGCTAAGCTGGGACAGATGATTACGGGGAAGTCC	1497

[FIG. 3]



- ◇— Dieta normal + no infección con *P. aeruginosa* (sin inyección)
- *— Dieta normal con peptidoglicano de *L. plantarum* PGN + no infección con *P. aeruginosa* (sin inyección)
- Dieta normal + infección con *P. aeruginosa* (con inyección)
- Dieta normal con peptidoglicano de *L. plantarum* PGN + infección con *P. aeruginosa* (con inyección)