

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 437**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747	(2015.01)
C12N 1/20	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A61K 35/745	(2015.01)
C12R 1/01	(2006.01)
C12R 1/225	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61K 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2018 PCT/KR2018/014271**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2019 WO19098810**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2018 E 18878662 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 3715449**

54 Título: **Bacterias del ácido láctico novedosas y su uso**

30 Prioridad:

20.11.2017 KR 20170155078
19.11.2018 KR 20180142811

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITY - INDUSTRY COOPERATION GROUP
OF KYUNG HEE UNIVERSITY (50.0%)
1732 Deogyong-daero, Giheung-gu
Yongin-si, Gyeonggi-do 17104, KR y
NAVIPHARM CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, DONG HYUN y
HAN, MYUNG JOO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 980 437 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 novedosas y su uso

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a *Lactobacillus mucosae* y *Bifidobacterium longum* como bacterias del ácido láctico novedosas. Específicamente, la presente divulgación se refiere a una composición que contiene las bacterias del ácido láctico novedosas para inhibir la expresión de la proteína p16 como factor de envejecimiento e inhibir la expresión de un factor inflamatorio, siendo así útil para la prevención y el tratamiento del deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental y para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Técnica antecedente

15 Entre las enfermedades causadas por el aumento de la población de edad avanzada, la pérdida de memoria, incluida la demencia, es la más problemática. Según el informe anual del Centro Central de Demencia del Ministerio de Salud y Bienestar Social, cada 12 minutos se produce un paciente con demencia y 650.000 personas padecen demencia. En particular, la demencia que se sabe que ocurre principalmente en personas mayores de 70 años o más, recientemente ocurre cada vez más en personas jóvenes debido a enfermedades crónicas, lesiones externas, factores genéticos y un estilo de vida deficiente.

Puede resultar difícil curar el deterioro de la memoria, incluida la demencia. Cuando se produce un deterioro de la memoria, se impone un dolor y una carga de por vida no sólo al paciente, sino también a su familia. Por tanto, los problemas derivados del mismo son de un nivel grave.

25 Además, los agentes para el tratamiento de la demencia disponibles comercialmente tienen un uso limitado debido a sus efectos secundarios relacionados con el sistema digestivo, tales como náuseas, vómitos, pérdida de apetito y dolor abdominal, y sus efectos secundarios, tales como enrojecimiento de la piel y picazón.

30 A partir del resultado de un estudio utilizando productos naturales, la Publicación de Solicitud de Patente Coreana N° 10-2016-0110767 divulga una composición alimenticia para mejorar la memoria utilizando un extracto de ciruela dátil. Sin embargo, no existen estudios sobre las bacterias del ácido láctico eficaces que puedan tratar el deterioro de la memoria, incluida la demencia.

35 **Divulgación**

[Problema técnico]

40 La presente divulgación se ha realizado en un esfuerzo por investigar un agente de tratamiento que pueda restaurar eficazmente el poder de la memoria. Los presentes inventores han identificado que una bacteria de ácido láctico novedosa aislada de heces humanas tiene efectos de mejorar el poder de la memoria y reducir el comportamiento de ansiedad y, por lo tanto, puede usarse para la prevención y el tratamiento del deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje y el trastorno mental. Por lo tanto, se ha completado la presente divulgación. Además, se ha identificado que las bacterias del ácido láctico novedosas aisladas de heces humanas pueden suprimir los factores inflamatorios y, por lo tanto, pueden usarse para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trastornos de la memoria, problemas de aprendizaje y trastornos mentales asociados con los factores inflamatorios.

[Solución técnica]

50 Un propósito según la presente divulgación es proporcionar *Lactobacillus mucosae* y *Bifidobacterium longum* como bacterias del ácido láctico novedosas.

Otro propósito según la presente divulgación es proporcionar una composición para prevenir o tratar el deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental, conteniendo la composición las bacterias del ácido láctico novedosas que suprimen la expresión de una proteína p16 como factor de envejecimiento.

Otro propósito más según la presente divulgación es proporcionar una composición para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias, conteniendo la composición las bacterias del ácido láctico novedosas. La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

60 [Efectos ventajosos]

Las bacterias del ácido láctico novedosas *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 según la presente divulgación tienen el efecto de suprimir la expresión de la proteína p16 como factor de envejecimiento y tiene un efecto de recuperación de la memoria y reduce el comportamiento de ansiedad. Por lo tanto, las bacterias del ácido láctico novedosas según la presente divulgación se pueden usar como composición para prevenir o tratar el deterioro

de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental.

Además, las bacterias del ácido láctico novedosas según la presente divulgación tienen el efecto de inhibir una respuesta inflamatoria y, por lo tanto, pueden estar contenidas en una composición para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias y son particularmente efectivas para prevenir y tratar la colitis.

Descripción de dibujos

La figura 1 muestra un gráfico que identifica que el comportamiento de alternancia espontánea se restablece a un nivel de un grupo normal (NOR) en una prueba de laberinto en forma de Y mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM), *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) o una mezcla 1:1 (ML) de las mismas a un modelo animal envejecido (Ag).

La figura 2 muestra un gráfico que identifica que el número de veces que un sujeto toca un nuevo objeto en una prueba de reconocimiento de objetos se restablece a un nivel de un grupo normal (NOR) mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM), *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) o una mezcla 1:1 (ML) de las mismas al modelo animal envejecido (Ag).

La figura 3 muestra un gráfico que identifica que el comportamiento de alternancia espontánea se restablece a un nivel de un grupo normal (NOR) en una prueba de laberinto en forma de Y mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM), *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal de enfermedad de Alzheimer (Tg).

La figura 4 muestra un gráfico que identifica que, en una prueba de evitación pasiva, el tiempo de latencia se restablece a un nivel de un grupo normal (NOR) mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal de enfermedad de Alzheimer (Tg).

La figura 5 muestra un gráfico que identifica que, en una prueba de laberinto de agua, el tiempo transcurrido en un cuadrante objetivo se restablece a un nivel de un grupo normal (NOR) mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal de enfermedad de Alzheimer (Tg).

La figura 6 muestra un diagrama que identifica que la actividad de NF-κB en el hipocampo se inhibe y la expresión de un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) aumenta mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal de enfermedad de Alzheimer (Tg).

(Desde la izquierda) Grupo de control; modelo animal de la enfermedad de Alzheimer; grupo tratado con LM; y grupo tratado con BL.

La figura 7 muestra un gráfico que identifica que cada tiempo transcurrido en un brazo abierto (OT) y una entrada en el brazo abierto (OE) se restablece a un nivel de un grupo normal (NOR) mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal deprimido.

La figura 8 muestra un gráfico que identifica que se reduce la inmovilidad en una prueba de natación forzada, lo que da como resultado una reducción del comportamiento de ansiedad y los síntomas de depresión, mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal deprimido.

La figura 9 muestra un gráfico que identifica que se reduce la inmovilidad en una prueba de suspensión de la cola, lo que da como resultado una reducción del comportamiento de ansiedad y los síntomas de depresión, mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal deprimido.

La figura 10 muestra un diagrama que identifica que la actividad de NF-κB en el hipocampo se inhibe y la expresión de un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) aumenta mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal deprimido.

La figura 11 es un gráfico que identifica una reducción significativa en el nivel de corticosterona en sangre mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal deprimido.

La figura 12 es un diagrama que identifica que la actividad de la microglía positiva para Iba1 disminuye significativamente mediante la administración de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM) o *Bifidobacterium longum* NK46 (BL) a un modelo animal deprimido.

Descripción detallada

En un aspecto para lograr el propósito, la presente divulgación proporciona *Lactobacillus mucosae* NK41 (Organización depositaria: Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano, fecha de depósito: 4 de agosto de 2017, n.º de adhesión: KCCM12091P).

Lactobacillus mucosae NK41 según la presente divulgación es una bacteria del ácido láctico novedosa de *Lactobacillus mucosae* aislada e identificada a partir de heces humanas.

Una secuencia de bases de ADNr 16S para la identificación y clasificación de *Lactobacillus mucosae* NK41 según la presente divulgación es la misma que SEQ ID NO: 1 como se adjunta a la presente memoria descriptiva. Por lo tanto, *Lactobacillus mucosae* NK41 según la presente divulgación puede contener ADNr 16S representado por SEQ ID NO: 1.

Haciendo referencia al resultado del análisis de la secuencia de bases del ADNr 16S representada por la SEQ ID NO: 1, la secuencia de bases del ADNr 16S representada por la SEQ ID NO: 1 tiene un 99 % de homología con cepas de *Lactobacillus mucosae* conocidas, y por lo tanto tiene la relación molecular más alta con *Lactobacillus mucosae*. Por lo tanto, la bacteria del ácido láctico se identifica como *Lactobacillus mucosae*, se nombra como *Lactobacillus mucosae* NK41 y está depositada en el Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano el 4 de agosto de 2017 (n.º de acceso KCCM12091P).

Lactobacillus mucosae NK41 según la presente divulgación es una bacteria grampositiva, y una forma celular de la misma es *Bacilli*. Más específicamente, las propiedades fisiológicas de *Lactobacillus mucosae* NK41 se puede analizar según métodos convencionales en la técnica y los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación. Específicamente, *Lactobacillus mucosae* NK41 puede utilizar, como fuentes de carbono, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, amigdalina, esculina, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa, gentiobiosa y gluconato.

En otro aspecto para lograr el propósito, la presente divulgación proporciona *Bifidobacterium longum* NK46 (Depósito: Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano, fecha de depósito: 4 de agosto de 2017, n.º de acceso: KCCM12087P).

Bifidobacterium longum NK46 según la presente divulgación es una bacteria del ácido láctico novedosa de *Bifidobacterium longum* aislada e identificada a partir de heces humanas.

Una secuencia de bases de ADNr 16S para la identificación y clasificación de *Bifidobacterium longum* NK46 según la presente divulgación es la misma que SEQ ID NO: 2 adjunta a la presente especificación. Por consiguiente, *Bifidobacterium longum* NK46 según la presente divulgación puede contener ADNr 16S representado por SEQ ID NO: 2.

Haciendo referencia al resultado del análisis de la secuencia de bases del ADNr 16S representada por la SEQ ID NO: 2, la secuencia de bases del ADNr 16S representada por la SEQ ID NO: 2 tiene un 99 % de homología con cepas de *Bifidobacterium longum* conocidas, y tiene la relación molecular más alta con *Bifidobacterium longum*. Por lo tanto, la bacteria del ácido láctico se identifica como *Bifidobacterium longum*, se nombra como *Bifidobacterium longum* NK46 y está depositada en el Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano el 4 de agosto de 2017 (n.º de acceso KCCM12087P).

Bifidobacterium longum NK46 según la presente divulgación es una bacteria grampositiva, y una forma celular de la misma es *Bacilli*. Las propiedades fisiológicas de *Bifidobacterium longum* NK46 se puede analizar según métodos convencionales en la técnica y los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación. Específicamente, *Bifidobacterium longum* NK46 puede utilizar, como fuentes de carbono, L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, manitol, sorbitol, α -metil-D-glucósido, esculina, salicina, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa y D-turanosa.

En otro aspecto para lograr el propósito, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar el deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental, conteniendo la composición *Lactobacillus mucosae* NK41 KCCM12091P, *Bifidobacterium longum* NK46 KCCM12087P, o una mezcla de los mismos.

"*Lactobacillus mucosae* NK41" según la presente divulgación es el mismo que el descrito anteriormente.

Específicamente, *Lactobacillus mucosae* NK41 contenido en la composición farmacéutica según la presente divulgación puede ser un probiótico vivo del mismo, un probiótico destruido por calor del mismo, un cultivo del mismo, un lisado del mismo o un extracto del mismo. Cualquier forma de *Lactobacillus mucosae* NK41 que puede lograr el efecto de prevención o tratamiento del deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental se puede utilizar sin limitación.

"*Bifidobacterium longum* NK46" según la presente divulgación es el mismo que el descrito anteriormente.

Específicamente, el *Bifidobacterium longum* NK46 contenido en la composición farmacéutica según la presente divulgación puede ser un probiótico vivo del mismo, un probiótico destruido por calor del mismo, un cultivo del mismo, un lisado del mismo o un extracto del mismo. Cualquier forma de *Bifidobacterium longum* NK46 que puede lograr el efecto de prevención o tratamiento del deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental se puede utilizar sin limitación.

El término "cultivo" en la presente divulgación se refiere a una sustancia obtenida cultivando las bacterias del ácido láctico en un medio líquido o medio sólido conocido, y es el concepto que incluye las bacterias del ácido láctico novedosas en el presente documento.

5 El deterioro de la memoria y la discapacidad del aprendizaje según la presente divulgación pueden ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en envejecimiento, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, envejecimiento, traumatismo craneoencefálico, mala memoria, disminución del poder de la memoria, lesión cerebral traumática, epilepsia, esclerosis del hipocampo, dolor de cabeza, enfermedad cerebral senil, demencia y amnesia.

10 En una realización según la presente divulgación, se identifica que cuando se trata una célula nerviosa con *Lactobacillus mucosae* NK41 o *Bifidobacterium longum* NK46 junto con la hormona del estrés corticosterona, se inhibe la actividad de NF-kB, que se sabe que causa deterioro de la memoria como la enfermedad de Alzheimer y problemas de aprendizaje, y, al mismo tiempo, se inhibe la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que se sabe que tiene un nivel de expresión reducido en el envejecimiento y aumenta la demencia (Tabla 5). Además, en una realización según la presente divulgación, se identifica que cuando se administra *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 o una mezcla de los mismos al modelo animal envejecido y al modelo animal con enfermedad de Alzheimer, se logra un efecto de recuperación de la memoria, se suprime la expresión de p16 como factor de envejecimiento en el hipocampo, se suprime la actividad de NF-kB y aumenta la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (Ejemplo 4). En particular, se identifica que la mezcla de *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 muestra un mejor efecto que cuando se usa *Lactobacillus mucosae* NK41 o *Bifidobacterium longum* NK46 solo. Así, se identifica que la composición farmacéutica que contiene el *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 o una mezcla de los mismos puede ser útil para la prevención y el tratamiento del deterioro de la memoria y la discapacidad del aprendizaje.

25 Por lo tanto, la composición farmacéutica según la presente divulgación que contiene *Lactobacillus mucosae* NK41 KCCM12091P, *Bifidobacterium longum* NK46 KCCM12087P o una mezcla de los mismos, puede suprimir la expresión del factor de envejecimiento p16.

30 La p16 es una proteína representativa del factor de envejecimiento expresada a partir del gen CDKN2A humano. Así, se promueve el envejecimiento a medida que aumenta la expresión de p16.

El trastorno mental según la presente divulgación puede ser uno cualquiera o más seleccionados del grupo que consiste en ansiedad, síntomas depresivos, trastornos del estado de ánimo, insomnio, trastorno delirante, trastorno obsesivo compulsivo, migraña, estrés, trastorno cognitivo y trastorno de atención.

35 En una realización según la presente divulgación, se identifica que el comportamiento de ansiedad inducida por el estrés se reduce significativamente cuando se administra *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46, o una mezcla de los mismos a un modelo animal inducido por estrés (Tabla 8). Así, se identifica que la composición farmacéutica que contiene el *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 o una mezcla de los mismos puede ser útil para la prevención y el tratamiento de trastornos mentales.

40 En otro aspecto para lograr el propósito, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la enfermedad inflamatoria, conteniendo la composición *Lactobacillus mucosae* NK41 KCCM12091P, *Bifidobacterium longum* NK46 KCCM12087P, o una mezcla de los mismos.

"*Lactobacillus mucosae* NK41" y "*Bifidobacterium longum* NK46" según la presente divulgación son los mismos que los descritos anteriormente.

50 Las enfermedades inflamatorias según la presente divulgación pueden ser una cualquiera o más seleccionadas del grupo que consiste en artritis, gota, hepatitis, asma, obesidad, queratitis, gastritis, enteritis, nefritis, colitis, diabetes, tuberculosis, bronquitis, pleuresía, peritonitis, espondilitis, pancreatitis, dolor inflamatorio, uretritis, cistitis, vaginitis, aterosclerosis, sepsis, quemaduras, dermatitis, periodontitis y gingivitis.

55 En una realización según la presente divulgación, se identifica que la respuesta inflamatoria se inhibe significativamente cuando se administra *Lactobacillus mucosae* NK41 o *Bifidobacterium longum* NK46 junto con lipopolisacárido como sustancia inductora de respuesta inflamatoria, a macrófagos aislados de ratón (Tabla 4). Así, se identifica que la composición farmacéutica que contiene el *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 puede ser útil para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

60 Específicamente, la enfermedad inflamatoria puede ser colitis.

65 En una realización según la presente divulgación, se identifica que cuando se administra el *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 o una mezcla de los mismos a un modelo animal que tiene colitis inducida debido al estrés, una longitud de un intestino grueso como índice de colitis se restablece a un nivel normal, y la expresión y actividad de un indicador de colitis disminuye (Tabla 6). Así, se identifica que la composición farmacéutica que contiene

el *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46, o una mezcla de los mismos puede ser útil para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias, específicamente, la colitis.

Se puede preparar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento del deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental según la presente divulgación, o una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en formulaciones farmacéuticas usando métodos bien conocidos en la técnica para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración del mismo a un mamífero. En la preparación de la formulación, la composición farmacéutica según la presente divulgación puede contener adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable dentro de un intervalo que no inhiba la actividad de las bacterias del ácido láctico novedosas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, los comúnmente utilizados, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral, y similares. Además, la composición farmacéutica según la presente divulgación puede contener diluyentes o excipientes tales como cargas, diluyentes, aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes, tensioactivos y otros aditivos farmacéuticamente aceptables.

La dosificación de la composición farmacéutica según la presente divulgación debe ser una cantidad farmacéuticamente eficaz. "Cantidad farmacéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para prevenir o tratar el deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje, el trastorno mental o la enfermedad inflamatoria con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable al tratamiento médico. El nivel de dosis eficaz se selecciona de diversas formas por un experto en la técnica según factores tales como el método de formulación, el estado y el peso del paciente, el sexo del paciente, la edad, la gravedad de la enfermedad, la forma del fármaco, la vía y duración de la administración, la tasa de excreción y sensibilidad de respuesta. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de la vía de tratamiento, el uso de excipientes y la posibilidad de uso con otros agentes, como reconocen los expertos en la técnica. Sin embargo, para lograr el efecto deseado, en la administración oral de la composición según la presente divulgación, la composición generalmente se administra a un adulto en de 0,0001 a 100 mg por 1 kg de peso corporal por día, preferiblemente en de 0,001 a 100 mg por 1 kg de peso corporal por día. La administración podrá realizarse una vez al día, pudiéndose dividir en varias veces. La dosificación no limita el alcance de la presente divulgación de ninguna manera.

La composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento del deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental según la presente divulgación, o la composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias, se puede administrar a mamíferos tales como ratones, ganado y seres humanos a través de diversas vías. Específicamente, la composición farmacéutica según la presente divulgación puede administrarse por vía oral o parenteral (por ejemplo, aplicarse o inyectarse por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal). Sin embargo, se prefiere la administración oral. Las preparaciones sólidas para administración oral pueden incluir polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas, píldoras y similares. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden incluir agentes de suspensión, soluciones, emulsiones, jarabes, aerosoles, etc. Además del agua y la parafina líquida, que se utilizan comúnmente como diluyentes simples, están contenidos en éstas diversos excipientes, como agentes humectantes, edulcorantes, fragancias y conservantes. Las formulaciones para administración parenteral se formulan en forma de aplicaciones externas tales como soluciones acuosas, líquidos, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, gotas para los ojos, pomadas para los ojos, jarabes, supositorios, aerosoles, etc. e inyección estéril como se esteriliza según los métodos convencionales. Preferiblemente, se puede preparar y utilizar una composición farmacéutica tal como crema, gel, parche, spray, pomada, emplasto, loción, agente linimento, pomada para los ojos, gotas para los ojos, pasta o cataplasma. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a esto. Las formulaciones para administración tópica pueden ser anhidras o acuosas, dependiendo del régimen clínico. Como disolventes no acuosos y suspensiones se pueden utilizar propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, ésteres inyectables, tales como oleato de etilo. Como base para supositorios, se pueden usar witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina, glicerogelatina y similares.

En otro aspecto para lograr el propósito, la presente divulgación proporciona un método para prevenir o tratar el deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental, que comprende administrar *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46, o una mezcla de los mismos a un sujeto.

Los términos "*Lactobacillus mucosae* NK41", "*Bifidobacterium longum* NK46", "administración", "deterioro de la memoria, discapacidad del aprendizaje o trastorno mental" en la presente divulgación son los mismos que se han descrito anteriormente.

El sujeto se refiere a un animal y puede ser un mamífero capaz de recibir un efecto beneficioso mediante el tratamiento con las bacterias del ácido láctico novedosas según la presente divulgación. Ejemplos preferidos de tales sujetos incluyen primates, tales como seres humanos. Además, en el presente documento se pueden incluir sujetos que tienen expresión de la proteína p16 como factor de envejecimiento, síntomas de deterioro de la memoria, discapacidad de aprendizaje o trastorno mental, y sujetos que tienen riesgos de tener dichos síntomas.

En otro aspecto para lograr el propósito, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias, que comprende administrar *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 o una mezcla de los mismos a un sujeto.

En la presente divulgación, los términos "*Lactobacillus mucosae* NK41" y "*Bifidobacterium longum* NK46", "administración" e "inflamatorio" son los mismos que se han descrito anteriormente.

El sujeto se refiere a un animal y puede ser un mamífero capaz de recibir un efecto beneficioso mediante el tratamiento con las bacterias del ácido láctico novedosas según la presente divulgación. Ejemplos preferidos de tales sujetos incluyen primates, tales como seres humanos. Estos sujetos incluyen todos los sujetos que tienen actividad mieloperoxidasa aumentada, niveles de expresión aumentados de citocinas de TNF- α e IL-17, o actividad NF-kB aumentada o actividad COX-2. Además, pueden incluirse en éstos todos los sujetos que tienen un síntoma inflamatorio o un riesgo de padecer dicho síntoma. Específicamente, el sujeto puede ser un sujeto que tenga un síntoma de colitis, pero no se limita a ello.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un alimento funcional saludable para prevenir o aliviar el deterioro de la memoria, la discapacidad del aprendizaje o el trastorno mental, conteniendo el alimento *Lactobacillus mucosae* NK41 KCCM12091P, *Bifidobacterium longum* NK46 KCCM12087P o una mezcla de los mismos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un alimento funcional saludable para prevenir o aliviar la enfermedad inflamatoria, conteniendo el alimento *Lactobacillus mucosae* NK41 KCCM12091P, *Bifidobacterium longum* NK46 KCCM12087P o una mezcla de los mismos.

Los términos "*Lactobacillus mucosae* NK41" y "*Bifidobacterium longum* NK46", "administración" y "deterioro de la memoria, discapacidad del aprendizaje o trastorno mental" y "enfermedad inflamatoria" según la presente divulgación son los mismos que se han descrito anteriormente.

El alimento funcional saludable enfatiza la función biorreguladora del alimento. El alimento funcional saludable tiene un valor añadido al actuar y expresarse para un propósito específico utilizando métodos físicos, bioquímicos y biotecnológicos. Los componentes de estos alimentos funcionales saludables están diseñados y procesados para ejercer suficientemente, en el cuerpo vivo, las funciones de control corporal relacionadas con la biodefensa y el control del ritmo corporal, la prevención y la recuperación de enfermedades. Pueden contener aditivos alimentarios o edulcorantes alimentarios o materias primas funcionales aceptables para alimentos.

Cuando está contenido *Lactobacillus mucosae* NK41 o *Bifidobacterium longum* NK46 según la presente divulgación en el alimento funcional saludable (o aditivo de bebida funcional saludable), las bacterias del ácido láctico novedosas pueden añadirse tal como están o pueden usarse con otros alimentos o ingredientes alimentarios, o pueden usarse adecuadamente según métodos convencionales. Una cantidad añadida de *Lactobacillus mucosae* NK41 o *Bifidobacterium longum* NK46 puede determinarse adecuadamente según la finalidad de su uso (prevención, salud o mejora, tratamiento terapéutico).

Los alimentos funcionales saludables incluyen diversos nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), sabores tales como sabores sintéticos y sabores naturales, colorantes y potenciadores (queso, chocolate, etc.), ácido péctico y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloides protectores, agentes de ajuste del pH, estabilizadores, conservantes, glicerina, alcohol, agentes carbonatados utilizados en bebidas carbonatadas y similares. Además, los alimentos funcionales saludables según la presente divulgación pueden contener carne para la producción de bebidas de frutas y vegetales. Estos componentes se pueden usar solos o en combinación entre sí. Los contenidos de estos aditivos pueden seleccionarse generalmente entre un intervalo de 0,001 a 50 partes en peso basándose en el peso total de la composición.

No existen restricciones particulares sobre los tipos de alimentos funcionales saludables. Alimentos a los que pueden añadirse el *Lactobacillus mucosae* NK41 o *Bifidobacterium longum* NK46 pueden incluir salchichas, carne, pan, chocolate, snacks, dulces, confitería, ramen, pizza, otros fideos, chicles, productos lácteos que contengan helado, sopas diversas, bebidas, té, bebidas alcohólicas, complejos vitamínicos y similares. Cuando el alimento se formula en una bebida, los componentes líquidos añadidos al mismo además de las bacterias del ácido láctico novedosas pueden incluir, como en las bebidas ordinarias, diversos agentes aromatizantes o hidratos de carbono naturales, pero no se limitan a ellos. Los hidratos de carbono naturales descritos anteriormente comprenden monosacáridos (por ejemplo, glucosa, fructosa, etc.), disacáridos (por ejemplo, maltosa, sacarosa, etc.) y polisacáridos (por ejemplo, azúcares convencionales como dextrina, ciclodextrina, etc.) y alcoholes de azúcar como xilitol, sorbitol, eritritol, etc.

Los valores numéricos descritos en la presente memoria descriptiva deben interpretarse como que incluyen hasta un intervalo equivalente, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, se proporciona una realización preferida para ayudar a comprender la presente divulgación. Sin embargo, los siguientes ejemplos solo se proporcionan para que el experto en la técnica comprenda más fácilmente la presente divulgación, y los contenidos según la presente divulgación no se limitan a los mismos.

5

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de bacterias del ácido láctico

(1) Aislamiento de bacterias del ácido láctico de heces humanas

10 Se suspendieron heces humanas en caldo GAM (Nissui Pharmaceutical, Japón). Posteriormente, se tomó un sobrenadante del mismo y se trasplantó a medio agar BL (Nissui Pharmaceutical, Japón), y luego se sometió a cultivo anaeróbico a 37 °C durante aproximadamente 48 horas para formar colonias. Luego, se aislaron las cepas.

(2) Aislamiento de bacterias del ácido láctico del kimchi

15

Se trituraron kimchi de col china, kimchi de rábano o kimchi de cebolla verde, respectivamente, y de ellos se tomó un sobrenadante triturado, y luego se trasplantó a medio agar MRS (Difco, EE.UU.) y se sometió a cultivo anaeróbico a 37 °C durante aproximadamente 48 horas para formar colonias. Luego, se aislaron las cepas.

(3) Identificación de bacterias del ácido láctico aisladas

20 Se analizaron las características fisiológicas y las secuencias de ADNr 16S de las cepas aisladas de heces humanas o kimchi para identificar la especie de la cepa. Luego, se le asignó el nombre de la cepa. Los nombres de cepa asignados de las bacterias del ácido láctico se muestran en la Tabla 1 a continuación. Específicamente, las bacterias del ácido láctico aisladas del kimchi incluyeron *Lactobacillus plantarum* 5 tipos (números de identificación 1 a 5 de la Tabla 1), *Lactobacillus brevis* 5 tipos (números de identificación 6 a 10 de la Tabla 1), *Lactobacillus sakei* 5 tipos (números de identificación 11 a 15 de la Tabla 1), y *Lactobacillus curvatus* 5 tipos (números de identificación 16 a 20 de la Tabla 1). Las bacterias del ácido láctico aisladas de heces humanas incluyeron *Lactobacillus rhamnosus* 5 tipos (números de identificación 21 a 25 de la Tabla 1), *Lactobacillus plantarum* 5 tipos (números de identificación 26 a 30 de la Tabla 1), *Lactobacillus reuteri* 5 tipos (números de identificación 31 a 35 en la Tabla 1), *Lactobacillus johnsonii* 4 tipos (números de identificación 36 a 39 en la Tabla 1), *Lactobacillus mucosae* 3 tipos (números de identificación 40 a 42 en la Tabla 1), *Bifidobacterium adolescentis* 3 tipos (números de identificación 43 a 45 de la Tabla 1), y *Bifidobacterium longum* 5 tipos (números de identificación 46 a 50 de la Tabla 1).

35

[Tabla 1]

N.º ID	Nombre de cepa	N.º ID	Nombre de cepa
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK1	26	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK26
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK2	27	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK27
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	28	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK28
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK4	29	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK29
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK5	30	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK30
6	<i>Lactobacillus brevis</i> NK6	31	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31
7	<i>Lactobacillus brevis</i> NK7	32	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32
8	<i>Lactobacillus brevis</i> NK8	33	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33
9	<i>Lactobacillus brevis</i> NK9	34	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NK10	35	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35
11	<i>Lactobacillus sakei</i> NK11	36	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36
12	<i>Lactobacillus sakei</i> NK12	37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37
13	<i>Lactobacillus sakei</i> NK13	38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38
14	<i>Lactobacillus sakei</i> NK14	39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39
15	<i>Lactobacillus sakei</i> NK15	40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40
16	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK16	41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41
17	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK17	42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42
18	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK18	43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43
19	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK19	44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44
20	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK20	45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK21	46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK22	47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK23	48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48
24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK24	49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49
25	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK25	50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50

5 (4) Propiedades fisiológicas de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41

Entre las cepas descritas en la Tabla 1, *Lactobacillus mucosae* NK41 (n.º de acceso KCCM12091P) se identificó como *Bacilli* grampositivo. Además, el ADNr 16S de *Lactobacillus mucosae* NK41 tenía una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 1. Al analizar la secuencia de bases del ADNr 16S de *Lactobacillus mucosae* NK41 utilizando la búsqueda BLAST, se identificó que no se encontró la cepa de *Lactobacillus mucosae* que tuviera la misma secuencia de bases de ADNr 16S, y la secuencia de bases de ADNr 16S de *Lactobacillus mucosae* NK41 tenía un 99 % de homología con la secuencia de ADNr 16S de la cepa de *Lactobacillus mucosae* conocida.

La utilización de fuente de carbono entre las propiedades fisiológicas de *Lactobacillus mucosae* NK41 se analizó mediante una prueba de fermentación de azúcar utilizando un kit API 50 CHL. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación. En la siguiente Tabla 2, "+" indica un caso donde la utilización de fuente de carbono es positiva y "-" indica un caso en el que la utilización de fuente de carbono es negativa.

[Tabla 2]

Fuente de carbono	NK41	Fuente de carbono	NK41
CONTROL	-	Esculina	+
Glicerol	-	Salicina	-
Eritritol	-	Celobiosa	-
D-arabinosa	-	Maltosa	+
L-arabinosa	+	Lactosa	±
D-ribosa	+	Melibiosa	±
D-xilosa	+	Sacarosa	+
L-xilosa	-	Trehalosa	-
D-adonitol	-	Inulina	-
Metil-BD-Xilopiranosido	-	Melizitosa	-
D-galactosa	±	Rafinosa	+
D-glucosa	+	Almidón	-
D-fructosa	-	Glicógeno	-
D-manosa	-	Xilitol	-
L-sorbosa	-	Gentiobiosa	±
Rhamnosus	-	D-turanosa	-
Dulcitol	-	D-lixosa	-
Inositol	-	D-tagatosa	-
Manitol	-	D-fucosa	-
Sorbitol	-	L-fucosa	-
α-metil-Dmanósido	-	D-arabitol	-
α-metil-D-glucósido	-	L-arabitol	-
N-acetil-glucosamina	-	Gluconato	±
Amigdalina	±	2-ceto-gluconato	-
Arbutina	-	5-ceto-gluconato	-

(5) Propiedades fisiológicas de la bacteria del ácido láctico novedosa *Bifidobacterium longum* NK46

5

Entre las cepas descritas en la Tabla 1, *Bifidobacterium longum* NK46 (n.º de acceso KCCM12087P) se identificó como *Bacilli* grampositivo. Además, el ADNr 16S de *Bifidobacterium longum* NK46 tenía una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 2. Al analizar la secuencia de bases del ADNr 16S de *Bifidobacterium longum* NK46 utilizando la búsqueda BLAST, se identificó que no se encontró la cepa de *Bifidobacterium longum* que tuviera la misma secuencia de bases de ADNr 16S, y la secuencia de bases de ADNr 16S de *Bifidobacterium longum* NK46 tenía un 99 % de homología con la secuencia de ADNr 16S de la cepa de *Bifidobacterium longum* conocida.

10

15

La utilización de fuente de carbono entre las propiedades fisiológicas de *Bifidobacterium longum* NK46 se analizó mediante una prueba de fermentación de azúcar utilizando un kit API 50 CHL. El resultado se muestra en la siguiente Tabla 3. En la siguiente Tabla 3, "+" representa un caso donde la utilización de fuente de carbono es positiva y "-" representa un caso en el que la utilización de fuente de carbono es negativa.

[Tabla 3]

Fuente de carbono	NK46	Fuente de carbono	NK46
CONTROL	-	Esculina	+
Glicerol	-	Salicina	+
Eritritol	-	Celobiosa	-
D-arabinosa	-	Maltosa	+
L-arabinosa	+	Lactosa	+
D-ribosa	-	Melibiosa	+
D-xilosa	+	Sacarosa	+
L-xilosa	-	Trehalosa	-
D-adonitol	-	Inulina	-
Metil-BD-Xilopiranosido	-	Melizitosa	-
D-galactosa	+	Rafinosa	+
D-glucosa	+	Almidón	-
D-fructosa	+	Glicógeno	-
D-manosa	+	Xilitol	-
L-sorbosa	-	Gentiobiosa	-
Rhamnosus	-	D-turanosa	+
Dulcitol	-	D-lixosa	-
Inositol	-	D-tagatosa	-
Manitol	+	D-fucosa	-
Sorbitol	+	L-fucosa	-
α -metil-Dmanósido	-	D-arabitol	-
α -metil-D-glucósido	\pm	L-arabitol	-
N-acetil-glucosamina	-	Gluconato	-
Amigdalina	-	2-ceto-gluconato	-
Arbutina	-	5-ceto-gluconato	-

Ejemplo 2: Comparación de la actividad de bacterias del ácido láctico aisladas

5

(1) Actividad antioxidante (*in vitro*)

Se disolvió DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en etanol hasta alcanzar una concentración de 0,2 mM para preparar una solución de DPPH. Una suspensión de bacterias del ácido láctico (1×10^6 UFC/ml) o una solución de vitamina C (1 g/ml) se añadió a 0,1 ml de la solución de DPPH y se cultivó a 37 °C durante 20 minutos. La solución de cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 rpm para obtener un sobrenadante. Entonces se midió la absorbancia del sobrenadante a 517 nm para calcular la actividad antioxidante de las bacterias del ácido láctico aisladas. La actividad antioxidante de cada bacteria del ácido láctico se muestra en la Tabla 4 a continuación.

(2) Medición del indicador de inflamación en macrófagos

Se administraron 2 ml de tioglicolato estéril al 4 % a la cavidad abdominal de un ratón C57BL/6 (macho, 6 semanas de edad, 20 a 23 g). Después de 96 horas, se anestesió al ratón y se administraron 8 ml de medio RPMI 1640 en la cavidad abdominal del ratón. Después de 5 a 10 minutos, se extrajo un medio RPMI (macrófagos) en la cavidad abdominal del ratón, se centrifugó durante 10 minutos a 1.000 g y se lavó dos veces con medio RPMI 1640 nuevamente. Los macrófagos se colocaron en placas de 24 pocillos en un número de $0,5 \times 10^6$ por pocillo. Los macrófagos se trataron con las bacterias del ácido láctico aisladas (concentración de tratamiento final: 1×10^4 ufc/ml, en lo sucesivo en el presente documento, aplicándose la misma concentración de tratamiento) y la sustancia inductora de respuesta inflamatoria lipopolisacárido (LPS) durante 2 horas o 24 horas, y luego se obtuvieron el sobrenadante y las células. Las células obtenidas se colocaron en un tampón RIPA (Gibco) y se homogeneizaron. Los niveles de expresión de citocinas de TNF- α e IL-10 se midieron en un sobrenadante de cultivo tratado durante 24 horas usando un método de inmunotransferencia. Los niveles de expresión de p65 (NF- κ B), p-p65 (fósforo-NF- κ B) y β se midieron en las células obtenidas mediante tratamiento durante 2 horas usando un método de inmunotransferencia. El nivel de expresión del indicador de inflamación para cada bacteria del ácido láctico se muestra en la Tabla 4 a continuación.

(En las mediciones de actividad de la Tabla 4: +++ se refiere a > 90 % (muy fuerte); ++ se refiere a > 60 al 90 % (fuerte); + se refiere a > 20 al 60 % (débil); - se refiere a < 20 % (ineficaz), aplicándose la misma indicación a la Tabla 5)

[Tabla 4]

N.º ID	Nombre de cepa	Actividad antioxidante	Inhibición de TNF-α	Aumento del nivel de expresión de IL-10	Inhibición de NF-κB
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK1	+	+	+	+
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK2	+	++	+	+
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	+++	+++	+++	+++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK4	+	+	+	++
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK5	++	++	++	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> NK6	+	+	+	+
7	<i>Lactobacillus brevis</i> NK7	+	+	+	+
8	<i>Lactobacillus brevis</i> NK8	+	+	+	+
9	<i>Lactobacillus brevis</i> NK9	+	+	+	+
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NK10	~	+	+	+
11	<i>Lactobacillus sakei</i> NK11	+	+	+	+
12	<i>Lactobacillus sakei</i> NK12	~	++	+	+
13	<i>Lactobacillus sakei</i> NK13	~	++	++	+
14	<i>Lactobacillus sakei</i> NK14	~	+	+	+
15	<i>Lactobacillus sakei</i> NK15	+	+	+	+
16	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK16	+	+	+	+
17	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK17	+	+	+	+
18	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK18	+	+	+	+
19	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK19	+	+	+	+
20	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK20	+	+	+	+
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK21	+	+	+	+
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK22	+	+	+	+
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK23	+	+	+	+
24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK24	++	+	+	+
25	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK25	++	++	++	++
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK26	+	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK27	+	+	+	+
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK28	+	+	+	+
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK29	+	+	+	+
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK30	+	+	+	+
31	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31	+	+	+	+
32	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32	++	++	++	++
33	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33	+++	++	++	++
34	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34	+	+	+	+
35	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35	+	+	+	+
36	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36	++	++	++	+
37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37	++	++	++	++
38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38	+	+	+	+
39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39	+	+	+	+
40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40	++	++	++	++
41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41	++	++	+++	+++
42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42	+	+	+	+
43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43	+	+	+	+
44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44	++	++	++	++
45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45	+	+	+	+
46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46	+++	++	+++	+++
47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47	++	++	++	++
48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48	+	+	+	+
49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49	+++	+++	+++	+++
50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50	+	+	+	+

(3) Efecto de expresión de la proteína ZO-1 de la célula Caco2

5 Las células de cáncer colorrectal, células Caco2, se obtuvieron de un banco de líneas celulares coreano y se incubaron en medio RPMI 1640 durante 48 horas, y luego las células Caco2 se dispensaron en placas de 12 pocillos en una cantidad de 2×10^6 por pocillo. Cada pocillo se trató con $1 \mu\text{g}$ de LPS solo, o se trató con $1 \mu\text{g}$ de LPS y 1×10^4 UFC de las bacterias del ácido láctico y luego se cultivó durante 24 horas. A continuación, se recogieron del mismo las células cultivadas en cada pocillo y se midió el nivel de expresión de ZO-1 como proteína de unión firme usando un método de inmunotransferencia. El nivel de expresión de ZO-1 para cada bacteria del ácido láctico se muestra en la Tabla 5 a continuación.

10 **(4) Efecto de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y efecto de la actividad de NF-kB en las células SH-SY5Y**

15 Las células nerviosas SH-SY5Y se obtuvieron de un banco de líneas celulares coreano y se cultivaron en medio DMEM con un 10 % de FBS y un 1 % de antibióticos añadidos a esto, y se dispensaron en placas de 12 pocillos a 2×10^6 células por pocillo. Luego, las bacterias del ácido láctico (1×10^4 UFC/ml) y corticosterona se añadieron a una concentración de 300 mg/ml a cada pocillo, seguido de incubación. Luego, se midieron los niveles de expresión de NF-kB (p65, p-p65) y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) utilizando un método de inmunotransferencia. El nivel de expresión de BDNF y el nivel de actividad de NF-kB para cada bacteria del ácido láctico se muestran en la Tabla 5 a continuación.

20

[Tabla 5]

N.º ID	Nombre de cepa	Aumento del nivel de expresión de ZO-1	Aumento del nivel de expresión de BDNF	Inhibición de la actividad de NF- κ B
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK1	+	+	+
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK2	+	+	+
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	++	+	++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK4	+	+	+
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK5	++	+	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> NK6	+	+	+
7	<i>Lactobacillus brevis</i> NK7	+	+	+
8	<i>Lactobacillus brevis</i> NK8	+	+	+
9	<i>Lactobacillus brevis</i> NK9	+	+	+
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NK10	-	-	-
11	<i>Lactobacillus sakei</i> NK11	+	+	+
12	<i>Lactobacillus sakei</i> NK12	-	-	-
13	<i>Lactobacillus sakei</i> NK13	+	+	+
14	<i>Lactobacillus sakei</i> NK14	+	+	+
15	<i>Lactobacillus sakei</i> NK15	+	+	+
16	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK16	+	+	+
17	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK17	+	+	+
18	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK18	+	+	+
19	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK19	+	+	+
20	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK20	+	+	+
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK21	+	-	+
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK22	+	-	+
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK23	+	-	+
24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK24	++	+	++
25	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK25	+	+	++
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK26	+	+	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK27	+	+	+
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK28	+	+	+
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK29	+	+	+
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK30	+	+	+
31	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31	+	+	+
32	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32	++	+	++
33	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33	++	++	++
34	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34	+	+	+
35	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35	+	+	+
36	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36	+	++	+
37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37	++	+	++
38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38	+	+	+
39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39	+	-	+
40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40	++	+	++
41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41	++	++	+++
42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42	+	+	+
43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43	+	+	+
44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44	++	++	++
45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45	+	+	+
46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46	++	++	+++
47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47	+	++	++
48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48	+	+	+
49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49	+	+	++
50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50	+	+	+

(5) Resultado de la prueba

Al evaluar la actividad de bacterias del ácido láctico aisladas, se identificó que las bacterias del ácido láctico novedosas *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 entre las bacterias del ácido láctico aisladas aumentaron el nivel de expresión de la proteína de unión firme ZO-1, al tiempo que mostraban una excelente actividad antioxidante y efecto antiinflamatorio. En particular, se identificó que las bacterias del ácido láctico novedosas *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 inhibieron la actividad de NF- κ B, que se sabe que causa enfermedades relacionadas con el envejecimiento, tal como la enfermedad de Alzheimer, y, al mismo tiempo, aumentaron la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro que produce nervios cerebrales que disminuyen con el envejecimiento y la demencia (Tabla 4 y Tabla 5).

Ejemplo 3: Efectos antiinflamatorio y reductor de la colitis de las bacterias del ácido láctico novedosas**(1) Preparación de un modelo animal de colitis y administración de bacterias del ácido láctico al mismo**

6 ratones C57BL/6 (machos, de 21 a 23 g, 6 semanas de edad) formaron un grupo que se adaptó a una sala de pruebas durante 1 semana. Un grupo se utilizó como grupo normal y el otro grupo se trató con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) para inducir colitis. Específicamente, después de anestesiarse a los animales de prueba con éter, se inyectaron 0,1 ml de solución de TNBS mezclada con etanol al 50 % en el intestino grueso a través del ano usando una jeringa de 1 ml con punta redonda, y los animales de prueba se elevaron verticalmente durante 30 segundos para causar inflamación. Mientras tanto, al grupo normal se le administraron por vía oral 0,1 ml de solución salina fisiológica. Después de la administración, la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 o una mezcla 1:1 de las mismas se suspendió en solución salina fisiológica que a su vez se le administró por vía oral en una cantidad de 1×10^9 UFC una vez al día durante 3 días a partir del día siguiente. Al día siguiente, cuando terminó la administración de bacterias del ácido láctico, se sacrificó el animal de prueba y se extrajo una porción del colon desde el ciego hasta un sitio inmediatamente antes del ano y luego se midió su longitud. Luego, se identificaron diversos indicadores siguientes en función de la longitud. Por otro lado, a los animales de prueba del grupo normal se les administró por vía oral una solución de dextrosa al 1 % como suspensión de bacterias del ácido láctico en lugar de las bacterias del ácido láctico novedosas. Además, un animal de prueba de un grupo de control positivo fue tratado por vía oral con un fármaco para el tratamiento de la colitis, sulfasalazina, en una cantidad de 50 mg/kg en lugar de las bacterias del ácido láctico novedosas.

(2) Medición de la actividad mieloperoxidasa

Se añadieron 200 μ l de tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5 % a 100 mg de tejido de colon y se homogeneizaron. El sobrenadante se obtuvo mediante centrifugación durante 10 minutos a 4 °C y 10.000 g. Se añadieron 50 μ l del sobrenadante a 0,95 ml de una solución de reacción (que contenía tetrametilbencidina 1,6 mM y H₂O₂ 0,1 mM) y se midió la absorbancia a lo largo del tiempo a 650 nm mientras reaccionaba a 37 °C. La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) se calculó mientras que 1 μ mol/ml de H₂O₂ generado como reactivo se definió como una unidad.

(3) Medición del indicador de inflamación

Se utilizaron métodos de inmunotransferencia tipo Western para medir materiales indicadores de la respuesta inflamatoria, como p-p65, p65, COX-2 e IL-17. Específicamente, se obtuvieron 50 μ g de sobrenadante de la misma manera que en la prueba de medición de la actividad de mieloperoxidasa (MPO) como se describió anteriormente y se sometieron a inmunotransferencia. Además, se midió el nivel de expresión de citocinas del mismo usando un kit ELISA.

(4) Resultado de la prueba

Los resultados de la prueba realizada en la prueba anterior se muestran en la Tabla 6 a continuación.

[Tabla 6]

Grupo de ensayo	Cambio de peso	Longitud del colon cm	Actividad de MPO μ U/g	TNF- α pg/mg	IL-17 pg/mg	Actividad de NF- κ B p-p65/p65	Actividad de COX-2
Grupo normal	0,6	6,5	0,36	22	9	0,11	0,21
Grupo con colitis inducida	-2,5	4,3	1,79	185	52	0,34	0,56
LM NK41	-0,8	4,6	0,82	85	42	0,24	0,35
BL NK46	-0,3	4,8	0,78	68	38	0,27	0,31
NK41+NK46	-0,5	5,1	0,79	82	39	0,24	0,32
Grupo positivo	-0,54	4,7	0,98	75	41	0,29	0,41

5 Específicamente, se identificó que en un grupo tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46, o una mezcla de los mismos, no hubo toxicidad porque el cambio de peso no fue grande. Además, cuando se indujo la colitis, la longitud del colon se hizo más corta. Sin embargo, se identificó que en el grupo tratado con las bacterias del ácido láctico novedosas, se recuperó la longitud del colon. Además, en el grupo tratado con las bacterias del ácido láctico novedosas, se puede reducir el aumento de la actividad mieloperoxidasa debido a la inducción de colitis. Se identificó que se suprimieron los niveles de expresión de citocinas de TNF- α e IL-17, y que se suprimieron la actividad de NF- κ B y la actividad de COX-2.

Así, se identificó que la bacteria del ácido láctico novedosa era eficaz en la prevención y el tratamiento de la colitis sin mostrar toxicidad.

15 **Ejemplo 4: Identificación del efecto de mejora de la memoria utilizando bacterias del ácido láctico novedosas contra el deterioro de la memoria debido al envejecimiento**

(1) Prueba de laberinto en forma de Y

20 Un dispositivo de laberinto en forma de Y utilizado en la prueba tenía tres brazos que se extendían en forma de la letra Y, y cada brazo tenía una longitud de 25 cm, una altura de 14 cm y un ancho de 5 cm. El ángulo entre brazos adyacentes era de 120 grados. El dispositivo se utilizó en una prueba de memoria a corto plazo.

25 Específicamente, la cabeza del animal de prueba se dirigió hacia el extremo de un brazo del laberinto en forma de Y. Al animal de prueba se le permitió vagar libremente por los brazos durante 8 minutos. Se registró el movimiento del animal. Cuando la pata trasera del animal entraba en el brazo, se consideraba una entrada en el brazo. El movimiento de los animales se representó por tiempos de alternancia. Un único tiempo de alternancia se definió como aquel momento en el que el animal pasó por los tres brazos en sucesión. El comportamiento de alternancia espontánea (alternancia espon.) se expresó como un porcentaje entre los tiempos de alternancia reales y los tiempos de alternancia máximos posibles (es decir, tiempos de alternancia totales menos 2).

(2) Prueba de evitación pasiva

35 Se realizó una prueba de evitación pasiva para evaluar la memoria a largo plazo. Específicamente, el ratón se colocó en un compartimiento bien iluminado (bombilla de 50 W), se le permitió buscar durante 10 segundos y luego se abrió una puerta de guillotina (5 x 5 cm) para entrar en un compartimiento oscuro (Sistema de evitación Gemini; San Diego, EE.UU.). Se midió el tiempo transcurrido hasta que el ratón entró en el compartimiento oscuro después de abrir la puerta de guillotina. Esto se definió como una prueba de adquisición. Una vez que las cuatro patas del ratón entraron en el compartimiento oscuro, se cerró la puerta de la guillotina. Una descarga eléctrica de 0,5 mA fluyó a través del fondo de una rejilla durante 3 segundos para que el ratón recordara esta situación. Para identificar los efectos de las bacterias del ácido láctico novedosas, se realizó una prueba de evitación pasiva 24 horas después de finalizar la prueba de adquisición. Se midió el tiempo que tardaron las cuatro patas del ratón en entrar en el compartimiento oscuro después de un tiempo de búsqueda de 10 segundos y entonces después de que se abrió la puerta de guillotina y se definió como tiempo de latencia. Mientras se estableció un tiempo de latencia máximo en 300 segundos, se midió un tiempo de latencia real (prueba de retención).

Según la interpretación del resultado conocido de la prueba, cuanto mayor sea el tiempo de latencia real, mejor será la memoria.

50 (3) Prueba del laberinto de agua

Para someter a prueba la memoria a largo plazo y la capacidad de percepción espacial, se realizó una prueba de

laberinto de agua (prueba de laberinto de agua de Morris) en un tanque de agua circular que contenía 500 ml de leche correspondientes a una profundidad de 30 cm del mismo bajo luz débil a 20 ± 1 °C. El tanque de agua circular tenía un diámetro de 90 cm y una altura de 45 cm. Específicamente, el tanque de agua se dividió en cuatro regiones virtuales y se instaló un andamio de 6 cm de diámetro en uno de los cuatro cuadrantes, mientras que la distancia entre la cara superior del agua y el andamio era de 1 cm. Es decir, el andamio tenía un nivel vertical de 29 cm desde el fondo del tanque. El primer día de entrenamiento, se realizó entrenamiento de natación durante 60 segundos sin el andamio, y luego, durante los 4 días restantes, se realizó entrenamiento para encontrar el andamio cuatro veces al día (ensayo de entrenamiento). Se permitió que el ratón permaneciera en el andamio durante 10 segundos. Cuando el ratón no pudo encontrar el andamio durante 60 segundos, se le permitió descansar sobre el andamio durante 10 segundos. Una vez finalizado el entrenamiento, el animal de prueba se secó con una lámpara UV. El entrenamiento se repitió cada 30 segundos. El tiempo necesario para encontrar el andamio se midió con una cámara de vídeo. En la prueba final, se retiró el andamio del tanque de agua y luego se colocó el animal de prueba en el tanque de agua. Luego, se midió el tiempo invertido en el cuadrante objetivo en el que estaba dispuesto el andamio (ensayo de sonda).

(4) Prueba de reconocimiento de objetos (prueba de objetos novedosos)

La prueba de reconocimiento de objetos se realizó en una caja (40 × 40 × 40 cm) fabricada de manera que el exterior no fuera visible desde el interior de la misma. Los objetos (A, A') de la misma forma y tamaño se dispusieron fijamente en la caja y el ratón empezó desde el centro de la caja. Se registró el número de veces que el ratón tocó los dos objetos durante 10 minutos. Después de 24 horas, uno de los dos objetos fue reemplazado por un objeto nuevo (A, B). Luego, se registró y calculó como porcentaje el número de veces (tiempo de exploración) que el ratón tocó los objetos originales y nuevos.

(5) Efecto de mejora de la memoria en modelos animales envejecidos

Se adquirió un ratón C57BL/6 (Ag, macho, 19 meses de edad) como modelo animal envejecido de la empresa Raon Bio para identificar los efectos de la inhibición de la expresión de la proteína p16 como factor de envejecimiento utilizando las bacterias del ácido láctico novedosas y la mejora de la memoria utilizando las bacterias del ácido láctico novedosas.

Específicamente, *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46, o una mezcla 1:1 de los mismos se administró al ratón en una concentración de 1×10^9 UFC/ratón/día durante 4 semanas, respectivamente. Luego, se realizaron la prueba del laberinto en forma de Y y la prueba de reconocimiento de objetos del Ejemplo 3, y una prueba de medición de un factor relacionado con la memoria en el hipocampo.

Con referencia a los resultados de la prueba, se identificó que en el modelo animal envejecido sin las bacterias del ácido láctico añadidas al mismo, el comportamiento de alternancia espontánea disminuyó en comparación con el grupo normal; pero en el grupo (Ag+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (Ag+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, y el grupo (Ag+ML) tratado con la mezcla de los mismos, el comportamiento de alternancia espontánea se restableció hasta un nivel del grupo normal (figura 1). Además, se identificó que en el grupo (Ag+ML) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (Ag+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, y el grupo (Ag+ML) tratado con la mezcla de los mismos, el número de veces que se tocó el nuevo objeto se recuperó hasta un nivel del grupo normal (figura 2). Se identificó que el grupo tratado con bacterias del ácido láctico suprimió la expresión del factor de envejecimiento p16, inhibió la actividad del factor inflamatorio NF-κB y aumentó la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro en comparación con el modelo animal envejecido (Tabla 7). En particular, se identificó que la mezcla de *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 mostró un mejor efecto que la bacteria del ácido láctico individual.

[Tabla 7]

	P16/ β -actina	BDNF/ β -actina	p-p65/p65
Grupo normal	0,21	0,43	0,21
Ag	0,45	0,28	0,33
Ag+LN	0,34	0,34	0,28
Ag+BL	0,30	0,37	0,29
Ag+ML	0,29	0,38	0,27

Así, se identificó que las bacterias del ácido láctico novedosas *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 y una mezcla de los mismos tuvieron un excelente efecto de mejora de la memoria en el modelo animal envejecido.

(6) Efecto de mejora de la memoria en un modelo animal con enfermedad de Alzheimer

El ratón Tg del modelo animal con enfermedad de Alzheimer [ratones B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) cepa 85Dbo/J-AD (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EE.UU.)] de 4 meses de edad se adquirió y se adaptó durante 2 meses.

Se adquirió un ratón C57BL/6 sano (Orient, Seúl, Corea) de 6 meses como grupo normal y se ajustó durante 2 meses. Los ratones Tg recibieron una dosis de la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41 o *Bifidobacterium longum* NK46 en una concentración de 1×10^9 UFC/ratón/día durante 8 semanas, respectivamente (el sábado y el domingo no se administró la bacteria del ácido láctico novedosa).

Posteriormente, se realizaron la prueba del laberinto en forma de Y, la prueba de evitación pasiva y la prueba del laberinto de agua del Ejemplo 3, y una prueba de medición de factores relacionados con la memoria en el hipocampo.

Con referencia a los resultados de la prueba, en la prueba del laberinto en forma de Y, el comportamiento de alternancia espontánea del ratón Tg sin las bacterias del ácido láctico añadidas al mismo se redujo en comparación con el grupo normal. El tiempo de latencia en la prueba de evitación pasiva del primero disminuyó en comparación con el segundo, y el tiempo de latencia en la prueba del laberinto de agua del primero aumentó en comparación con el segundo. Sin embargo, en el grupo (Tg+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41 y el grupo (Tg+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, el comportamiento de alternancia espontánea y el tiempo de latencia se recuperaron hasta los niveles del grupo normal (figura 3 a figura 5). Además, se identificó que el grupo tratado con bacterias del ácido láctico había inhibido la actividad de NF- κ B, un factor inflamatorio, y había aumentado la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, en comparación con los ratones Tg (figura 6).

Así, se identificó que la bacteria del ácido láctico novedosa *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 y una mezcla de las mismas tuvieron un excelente efecto de mejora de la memoria en el modelo animal con enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 5: Efectos de las bacterias del ácido láctico novedosas sobre la mejora de trastornos mentales

(1) Preparación de un modelo animal derivado de un trastorno mental - estrés por inmovilización (IS)

Para inducir trastornos mentales como el síndrome de ansiedad, la enfermedad depresiva o el estrés, se inmovilizó al ratón en un dispositivo de estrés por inmovilización cilíndrico de 3×10 cm. El estrés por inmovilización se repitió 5 veces levantando el ratón de manera que la cabeza del ratón se dirigiera hacia arriba una vez cada 2 días. Luego, se midió el comportamiento de ansiedad.

(2) Prueba de laberinto en cruz elevado (EPM)

El laberinto en cruz elevado (EPM) es un dispositivo experimental para medir el grado de trastornos mentales como el estrés o la ansiedad. El dispositivo de prueba de laberinto elevado en cruz utilizado en esta prueba se refiere a un dispositivo de vidrio flexible negro que tiene dos brazos abiertos (cada brazo de 30×7 cm) y dos brazos cerrados (cada brazo de 30×7 cm) con una pared de una altura de 20 cm, en el que los brazos están separados verticalmente del suelo en 50 cm y extendidos por 7 cm desde una plataforma central. En esta prueba, se midió el movimiento del ratón colocado en el laberinto elevado en cruz en una habitación que tenía una cámara de vídeo con un brillo de 20 lux dispuesta en la parte superior del mismo.

Específicamente, el ratón C57BL/6 (macho, de 19 a 22 g) se colocó en el medio del laberinto en cruz elevado y se dirigió la cabeza hacia el brazo abierto. Se midieron el tiempo y el número de veces invertidos en los brazos abiertos y cerrados durante 5 minutos. Cuando los cuatro pies entraron en el brazo, se contó una entrada en el brazo.

El tiempo invertido en el brazo abierto (OT) durante toda la duración de la prueba se calculó como $[\text{tiempo invertido en el brazo abierto} / (\text{tiempo invertido en el brazo abierto} + \text{tiempo invertido en el brazo cerrado})] \times 100$. La entrada en el brazo abierto (OE) se calculó como $[\text{entrada en el brazo abierto} / (\text{entrada en el brazo abierto} + \text{entrada en el brazo cerrado})] \times 100$. Después de cada prueba de comportamiento, el olor restante se eliminó con etanol al 70 %.

Según la interpretación conocida de los resultados de las pruebas, cuando disminuyó el tiempo invertido en el brazo abierto (OT) y la entrada en el brazo abierto (OE), se interpretó que aparecían síntomas de trastorno mental como síndrome de ansiedad o síntomas depresivos.

(3) Resultado de la prueba

Con referencia al resultado de la prueba, después de aplicar el estrés de inmovilización, en el ratón (IS) al que no se le administró la bacteria del ácido láctico, el tiempo invertido en el brazo abierto (OT) y la entrada del brazo abierto (OE) en la prueba del laberinto en cruz elevado disminuyó en comparación con el grupo normal (NOR). Sin embargo, se identificó que en el grupo administrado con *Lactobacillus mucosae* NK41 (IS+LM), el grupo administrado con *Bifidobacterium longum* NK46 (IS+BL) o una mezcla 1:1 de los mismos (IS+LM+BL), el tiempo invertido en el brazo abierto (OT) y la entrada en el brazo abierto (OE) aumentó (Tabla 8).

[Tabla 8]

	Tiempo invertido en un brazo abierto (OT) %	Entrada en el brazo abierto (OE) %
NOR	15,2	36,2
IS	4,5	17,5
IS+LM	16,1	34,6
IS+BL	14,5	32,1
IS+LM+BL	16,5	35,8

5 Así, se identificó que las bacterias del ácido láctico novedosas *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 tienen excelentes efectos de mejora de trastornos mentales como la ansiedad, la depresión y el estrés.

Ejemplo 6: Efecto de mejora del síndrome depresivo utilizando bacterias del ácido láctico novedosas

(1) Producción de un modelo murino deprimido

10 Para inducir la enfermedad de depresión, el ratón se fijó a un dispositivo de estrés por inmovilización cilíndrico de 3 × 10 cm y el ratón se inmovilizó durante 12 horas al día durante 2 días, de modo que se construyó un modelo murino deprimido. Posteriormente, a partir del día siguiente, se administró a esto *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM), *Bifidobacterium longum* NK46 (BL), o una mezcla 1:1 (ML) de los mismos durante 5 días, y luego se midieron los
15 indicadores de comportamiento depresivo al día siguiente del día de administración final.

(2) Prueba de laberinto en cruz elevado (EPM)

20 El dispositivo de prueba de laberinto elevado en cruz se utilizó en esta prueba que es un dispositivo de vidrio flexible negro que tiene dos brazos abiertos (cada brazo de 30 × 7 cm) y dos brazos cerrados (cada brazo de 30 × 7 cm) con una pared de una altura de 20 cm, en el que los brazos están separados verticalmente del suelo en 50 cm y extendidos por 7 cm desde una plataforma central. En esta prueba, se midió el movimiento del ratón colocado en el laberinto elevado en cruz en una habitación que tenía una cámara de vídeo con un brillo de 20 lux dispuesta en la parte superior del mismo.

25 Específicamente, el ratón C57BL/6 (macho, de 19 a 22 g) se colocó en el medio del laberinto en cruz elevado y se dirigió la cabeza hacia el brazo abierto. Se midieron el tiempo y el número de veces invertidos en los brazos abiertos y cerrados durante 5 minutos. Cuando los cuatro pies entraron en el brazo, se contó una entrada en el brazo.

30 El tiempo invertido en el brazo abierto (OT) durante toda la duración de la prueba se calculó como [tiempo invertido en el brazo abierto / (tiempo invertido en el brazo abierto + tiempo invertido en el brazo cerrado)] × 100. Después de cada prueba de comportamiento, el olor restante se eliminó con etanol al 70 %.

(3) Prueba de Natación Forzada (FST)

35 Basándose en un método como se define en Porsolts RM, Le Pichon M, Jalfre M, Nature 266: 730-732 (1977) [Depression: a new animal model sensitive to antidepressants], se llenó con agua a la temperatura de 25 ± 1 °C el tanque de agua que tenía un diámetro de 20 cm y una altura de 40 cm, de modo que la altura del agua fuera de 30 cm. Luego, cada ratón para la prueba se colocó en el tanque de agua. Los 2 minutos iniciales de un total de 6 minutos fueron tiempo de adaptación durante el cual no se realizó la medición. Luego, se midió el tiempo de inmovilidad del animal de prueba durante los siguientes 4 minutos. El estado inmóvil se refiere a un estado de flotación sobre el agua mientras se está de pie con un movimiento mínimo para exponer solo la cabeza al aire fuera del agua. Cuando se redujo el estado depresivo, se exhibió la reducción del estado inmóvil.

(4) Prueba de suspensión de la cola (TST)

45 Basándose en un método definido en Steru, L. et al., Psychopharmacology, (1985) 85, 367-370, [The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice.], se montó un dispositivo de fijación en una posición a 1 cm desde el extremo de la cola del ratón. El ratón se suspendió en una posición separada a 50 cm hacia arriba del suelo y se midió el tiempo de inmovilidad de los animales de prueba durante un total de 6 minutos.

(5) Medición de marcadores de síntomas de ansiedad y depresión

55 Como en el punto (1) anterior, el modelo murino deprimido se produjo aplicando estrés por inmovilización al mismo. Se administró a esto *Lactobacillus mucosae* NK41 (LM), *Bifidobacterium longum* NK46 (BL), o una mezcla 1:1 (ML) de los mismos durante 5 días, y entonces se midieron los marcadores de síntomas de ansiedad y depresión al día siguiente del día de administración final.

La corticosterona en sangre de ratón se midió mediante un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

(Ebioscience, San Diego, CA). Se midieron BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y NF-kB (p-p65, p65) usando el método de inmunotransferencia.

Específicamente, se extirpó quirúrgicamente el hipocampo. Se le añadió tampón de lisis RIPA que contenía un 1 % de cóctel de inhibidor de proteasa y un cóctel de inhibidor de fosfatasa. La homogeneización se realizó de manera uniforme, seguida de una centrifugación (13.200 × g, 10 min, 4 °C) para obtener un sobrenadante. El sobrenadante se sometió a electroforesis en un gel de SDS (dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida) al 12 % y luego se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y luego se bloqueó con una proteína de leche desnatada y se lavó. Posteriormente, el producto lavado se trató con anticuerpos frente a BDNF, p65, p-p65 y β-actina que se acoplaron a esto. Luego, el producto tratado se lavó y se trató con un anticuerpo secundario que contenía peroxidasa de rábano picante. Luego, las proteínas se identificaron utilizando un kit de detección de quimioluminiscencia mejorado.

(6) Inmunotinción de fluorescencia

Las rodajas de cerebro se fijaron en un portaobjetos de vidrio y se trataron con anticuerpo anti-Iba1 (molécula adaptadora de unión al calcio ionizada 1) (1:100, Abcam) o DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) según un método descrito por Lee *et al.* La microglía se identificó mediante un microscopio confocal.

(7) Resultado de la prueba

Como se muestra en la figura 7, después de la inducción de la enfermedad de depresión, en los ratones (DC) sin la administración de bacterias del ácido láctico añadidas a los mismos, el tiempo invertido en el brazo abierto (OT) y la entrada en el brazo abierto (OE) en la prueba del laberinto en cruz elevado disminuyó, en comparación con el grupo normal (NOR). Sin embargo, se identificó que en el grupo (DC+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (DC+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, o el grupo (DC+ML) tratado con una mezcla 1: 1 de los mismos, aumentó el tiempo invertido en el brazo abierto (OT) y la entrada en el brazo abierto (OE).

Así, se identificó que las bacterias del ácido láctico novedosas *Lactobacillus mucosae* NK41, *Bifidobacterium longum* NK46 y una mezcla de los mismos tenían un excelente efecto de reducción de los síntomas de depresión.

Como se muestra en la figura 8, se identificó que el comportamiento de ansiedad y los síntomas de depresión provocados por el estrés por inmovilización en la prueba de natación forzada se redujeron debido a la disminución de la inmovilidad en el grupo (DC+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (DC+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, o el grupo (DC+ML) tratado con una mezcla 1:1 de los mismos.

Como se muestra en la figura 9, se identificó que el comportamiento de ansiedad y los síntomas de depresión inducidos por el estrés por inmovilización en la prueba de suspensión de la cola se redujeron debido a la disminución de la inmovilidad en el grupo (DC+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (DC+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, o el grupo (DC+ML) tratado con una mezcla 1:1 de los mismos.

Como se muestra en la figura 10, en el hipocampo del modelo murino deprimido inducido por estrés por inmovilización, se redujo la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y se indujo la actividad de NF-kB. Por otro lado, se identificó que la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) aumentó y la actividad de NF-kB se inhibió en el grupo (DC+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (DC+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, o el grupo (DC+ML) tratado con una mezcla 1:1 de los mismos.

Además, como se muestra en la figura 11, al medir la corticosterona en la sangre, en el modelo murino deprimido, la corticosterona aumentó significativamente. Sin embargo, se identificó que la corticosterona en sangre se redujo significativamente en el grupo (DC+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (DC+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, o el grupo (DC+ML) tratado con una mezcla 1:1 de los mismos.

Además, al observar la microglía activada positiva para Iba1 en el hipocampo, como se muestra en la figura 12, en el modelo murino deprimido, se observó la activación de la microglía positiva para Iba1 en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Sin embargo, se identificó que la activación de Iba1 y microglía observada en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo disminuyó significativamente en el grupo (DC+LM) tratado con *Lactobacillus mucosae* NK41, el grupo (DC+BL) tratado con *Bifidobacterium longum* NK46, o el grupo (DC+ML) tratado con una mezcla 1:1 de los mismos.

De los resultados anteriores, se identificó que las bacterias del ácido láctico novedosas *Lactobacillus mucosae* NK41 y *Bifidobacterium longum* NK46 tienen un excelente efecto reductor de los síntomas de depresión y síntomas de ansiedad.

<Información sobre la deposición de bacterias del ácido láctico>

Los presentes inventores han depositado una patente de *Lactobacillus mucosae* NK41 el 4 de agosto de 2017 en el Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano como organización depositaria acreditada (Dirección: Yurim Building, 45, 2-ga-gil, Hongjenseong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), por lo que se le asignó un número de acceso, KCCM12091P.

Además, los presentes inventores han depositado una patente de *Bifidobacterium longum* NK46 el 4 de agosto de 2017 en el Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano como organización depositaria acreditada (Dirección: Yurim Bldg, 45, 2-ga-gil, Hongjenae, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), por lo que se le asignó un número de acceso, KCCM12087P.

5

Nombre del depositario: Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano (en el extranjero)

Número de acceso: KCCM12087P

Fecha de Depósito: 4 de agosto de 2017

10

Nombre del depositario: Centro de Cultivos de Microorganismos Coreano (en el extranjero)

Número de acceso: KCCM12091P

Fecha de Depósito: 4 de agosto de 2017

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus mucosae* NK41 (número de acceso: KCCM12091P).
- 5 2. El *Lactobacillus mucosae* NK41 (número de acceso: KCCM12091P) de la reivindicación 1, en donde el *Lactobacillus mucosae* NK41 suprime la expresión de la proteína p16 como factor de envejecimiento.
3. El *Lactobacillus mucosae* NK41 (número de acceso: KCCM12091P) de la reivindicación 1, en donde el *Lactobacillus mucosae* NK41 comprende una secuencia de bases de ADNr 16S de SEQ ID NO: 1.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende *Lactobacillus mucosae* NK41 (número de acceso: KCCM12091P), un probiótico destruido por calor del mismo, un cultivo del mismo, un lisado del mismo o un extracto del mismo.
- 15 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en donde la composición farmacéutica comprende además *Bifidobacterium longum* NK46 (número de acceso: KCCM12087P), un probiótico destruido por calor del mismo, un cultivo del mismo, un lisado del mismo o un extracto del mismo.
- 20 6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento del deterioro de la memoria o la discapacidad del aprendizaje, en donde el deterioro de la memoria o la discapacidad del aprendizaje es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y enfermedad de Pick.
- 25 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad inflamatoria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en gastritis, enteritis, nefritis, colitis y pancreatitis.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 para su uso en la prevención, el alivio o el tratamiento de un trastorno mental, en donde el trastorno mental es ansiedad o depresión.
- 30 9. Un alimento funcional saludable que comprende *Lactobacillus mucosae* NK41 (número de acceso: KCCM12091P), un probiótico destruido por calor del mismo, un cultivo del mismo, un lisado del mismo o un extracto del mismo.

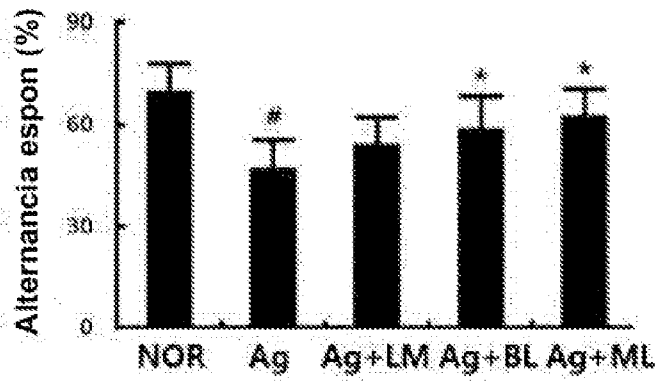


FIGURA 1

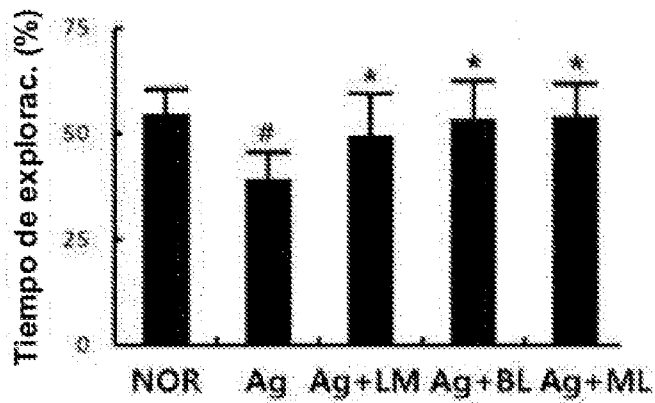


FIGURA 2

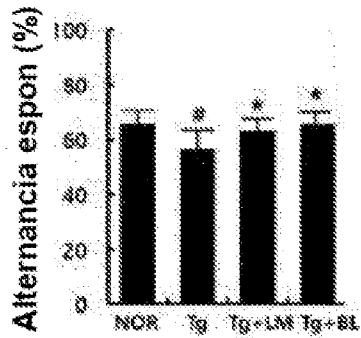


FIGURA 3

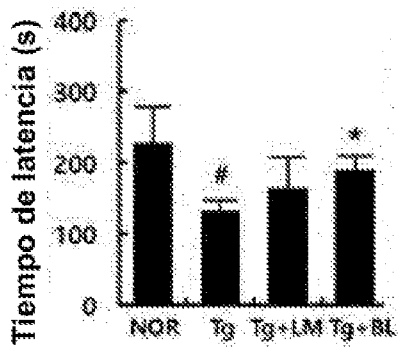


FIGURA 4

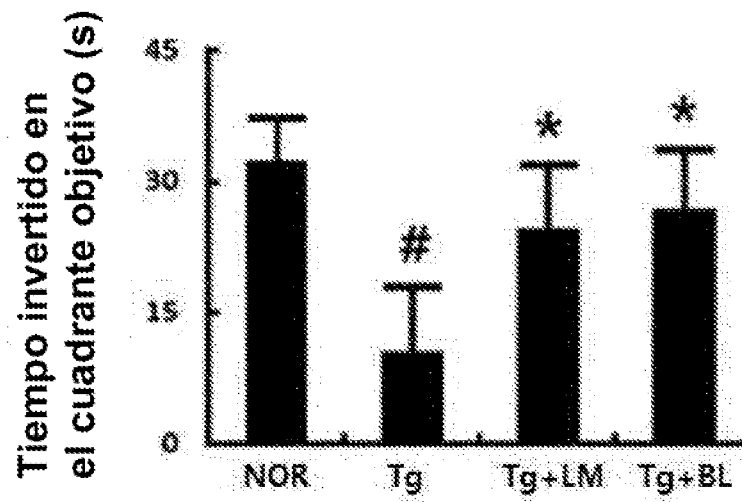


FIGURA 5

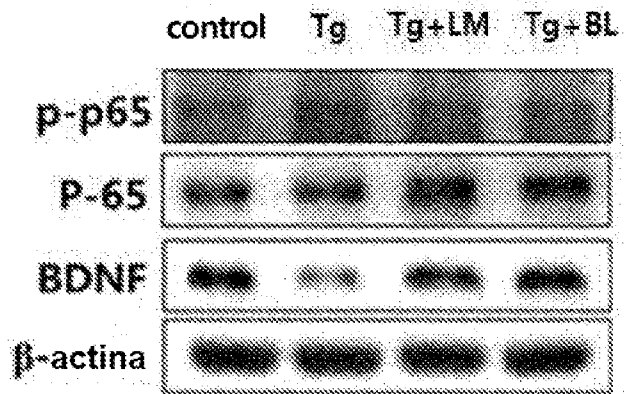


FIGURA 6

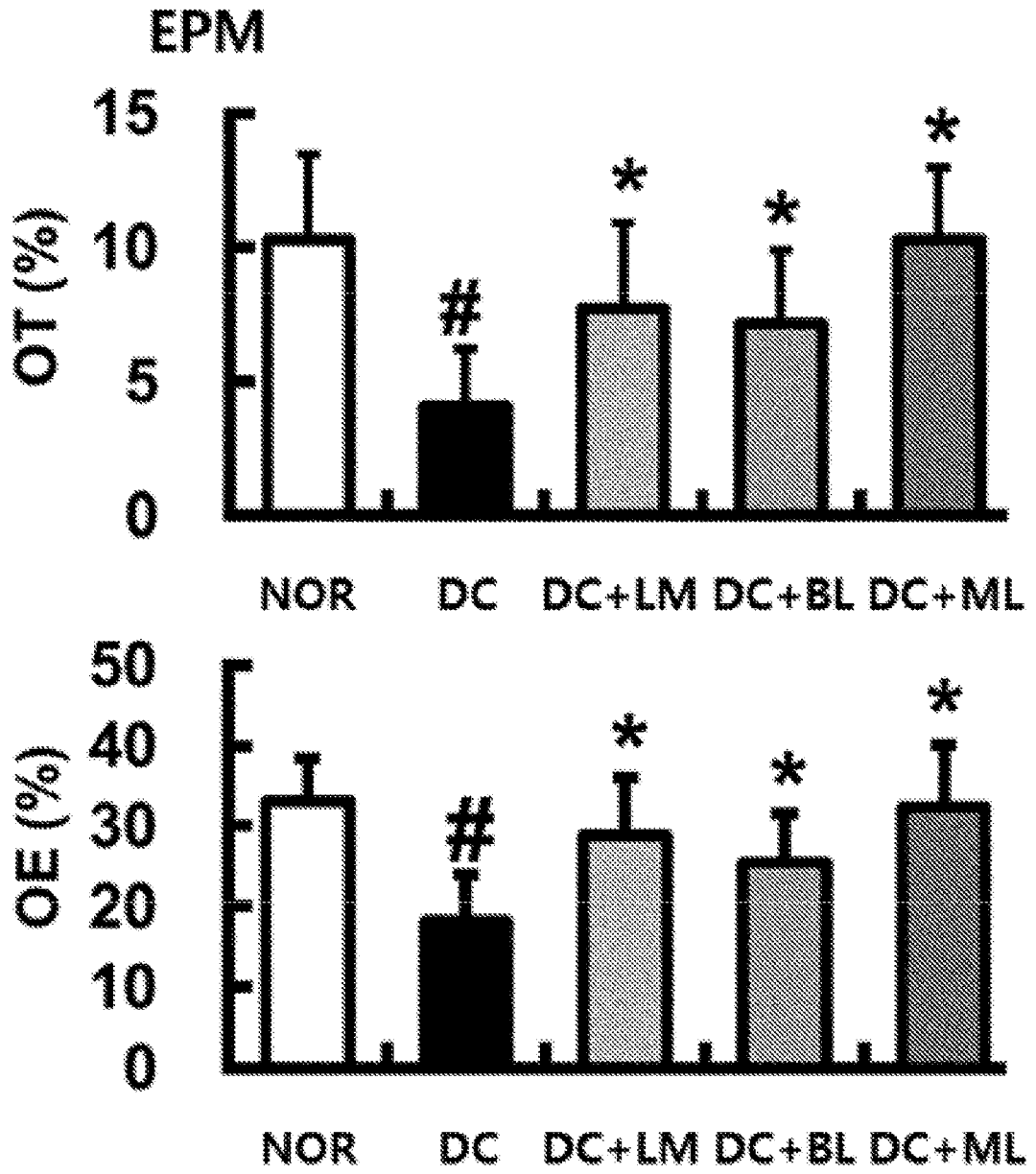


FIGURA 7

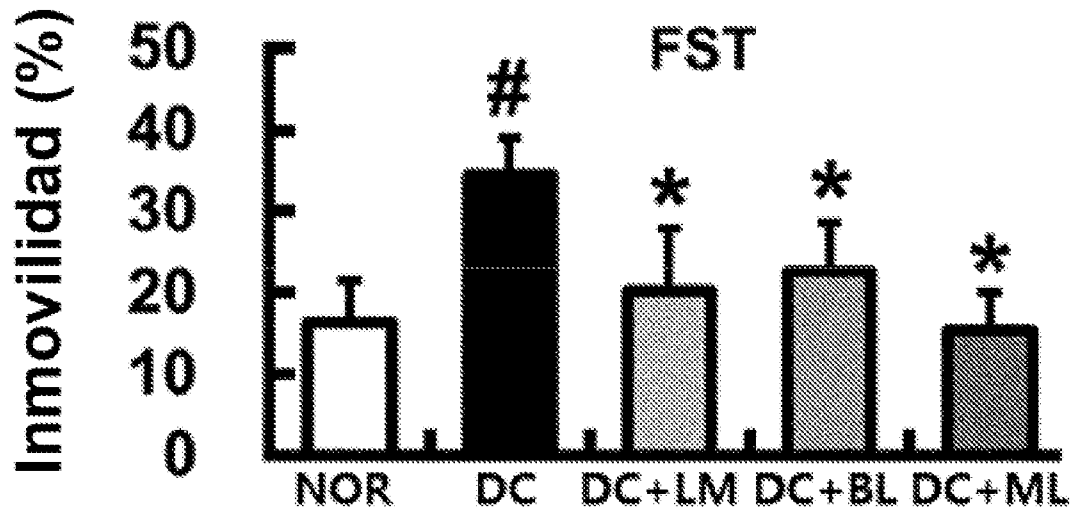


FIGURA 8

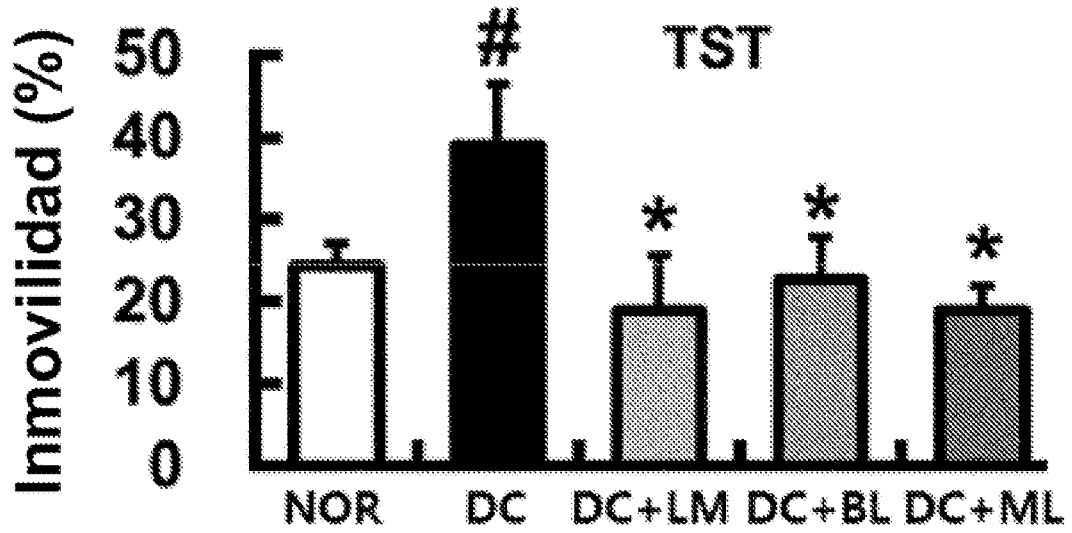


FIGURA 9

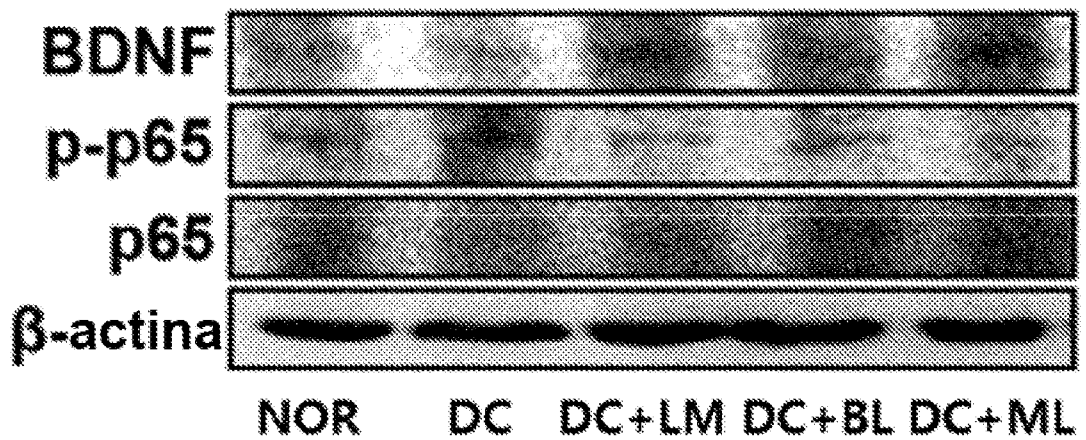


FIGURA 10

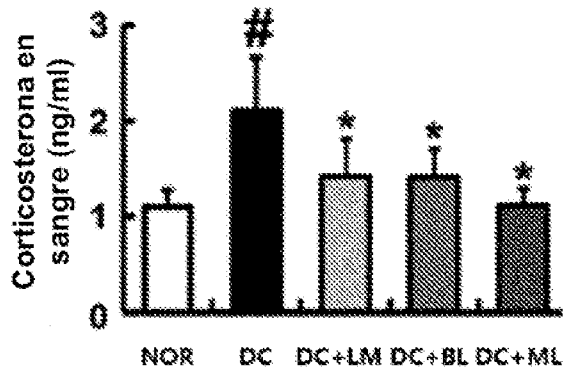


FIGURA 11

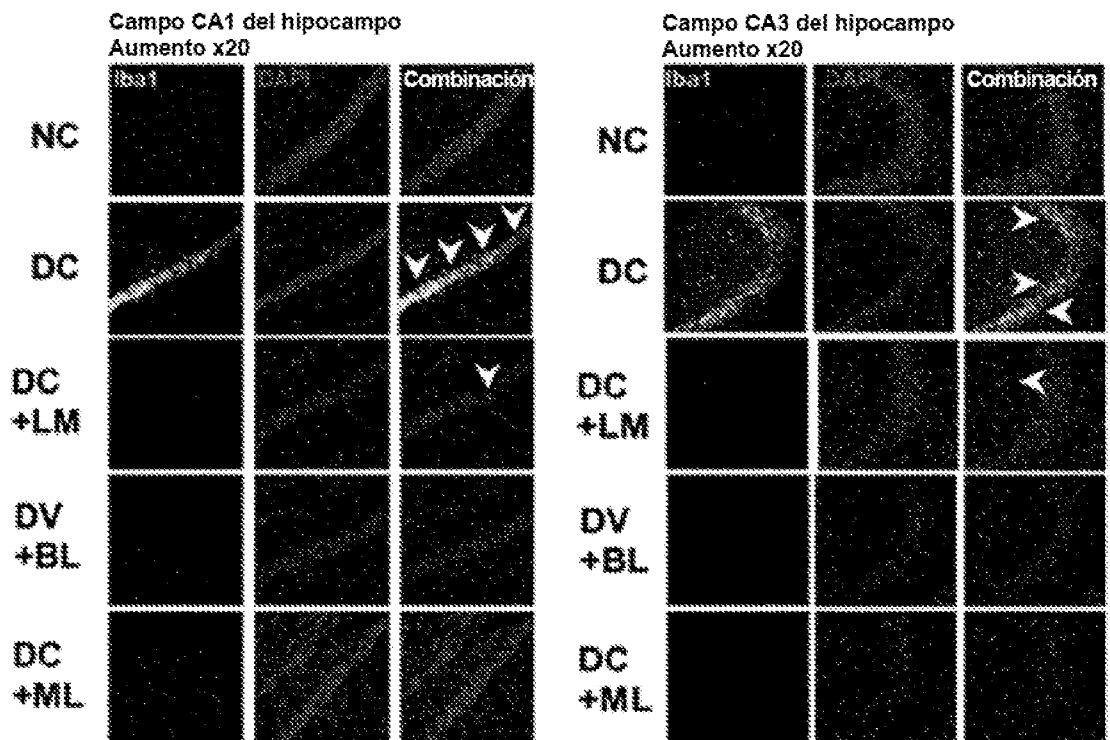


FIGURA 12