(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 647 922**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/74	(2015.01)
A61P 3/04	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
A23C 9/13	(2006.01)
C12R 1/01	(2006.01)
A23C 9/123	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A61K 35/745	(2015.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2010** **PCT/JP2010/066193**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011** **WO11034166**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2010** **E 10817279 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2478910**

(54) Título: **Agente anti-obesidad, alimento o bebida anti-obesidad, agente que mejora la tolerancia a la glucosa, y alimento o bebida para mejorar la tolerancia a la glucosa**

(30) Prioridad:

17.09.2009 JP 2009215836

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KONDO SHIZUKI y
SHIMIZU KANETADA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 922 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

Agente anti-obesidad, alimento o bebida anti-obesidad, agente que mejora la tolerancia a la glucosa, y alimento o bebida para mejorar la tolerancia a la glucosa

Campo Técnico

La presente invención se refiere a un agente contra la obesidad, un alimento o una bebida contra la obesidad, un agente de mejora de la tolerancia a la glucosa, y un alimento o una bebida para la mejora de la tolerancia a la glucosa que contiene un *Bifidobacterium breve* específico como un componente activo, de acuerdo con lo definido en forma adicional en las reivindicaciones.

Antecedentes

A medida que el estilo de vida del pueblo japonés se vuelve más occidentalizado y el envejecimiento de la población continúa progresando rápidamente, el número de pacientes con enfermedades relacionadas con el estilo de vida tales como la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular y la diabetes continúa incrementando. Una de las principales causas de este tipo de enfermedades relacionadas con el estilo de vida es la obesidad, y la importancia de prevenir y remediar la obesidad se destacó ampliamente. Además, la obesidad también es vista como indeseable desde el punto de vista de la apariencia y la belleza, y hay mucho interés en las dietas con el fin de prevenir o remediar la obesidad.

Contra este tipo de antecedente de mayor conciencia con respecto a la obesidad, un criterio diagnóstico conocido como "síndrome metabólico" se ha identificado como el incremento de la probabilidad de la aparición futura de una enfermedad relacionada con el estilo de vida, y la medición de la circunferencia de la cintura se utiliza en exámenes médicos con el propósito de prevenir y/o remediar el síndrome metabólico.

Los ejemplos de métodos que se utilizan de manera convencional para hacer frente a la obesidad incluyen tratamientos dietéticos (restricción en la dieta y ayunos), los tratamientos basados en ejercicio (que promueven el consumo de energía a través del ejercicio), y los tratamientos basados en fármacos. Los ejemplos de los fármacos actualmente utilizados en los tratamientos basados en fármacos incluyen Orlistat, que inhibe la absorción de grasa en el tracto intestinal (tal como los fármacos "Xenical" (una marca registrada) fabricado por Roche Ltd., y "Alli" (una marca registrada) fabricado por GlaxoSmithKline plc.), y Acarbosa, que es un inhibidor de la enzima glucolítica (α-glucosidasa) (tal como el fármaco "Glucobay" (una marca registrada) fabricado por Bayer AG).

Sin embargo, el uso excesivo de estos tratamientos puede provocar una serie de problemas, que incluye el deterioro de la salud del paciente, el incremento de peso debido a los rebotes, y la dificultad en la consecución de un tratamiento continuo o a largo plazo. En particular en el caso de los métodos basados en fármacos, los efectos secundarios también tienden a ser un problema. Además, los fármacos utilizados en los tratamientos basados en fármacos son fármacos farmacéuticos, y en particular no son fáciles de utilizar.

Las pruebas en la inhibición de la obesidad por el uso de microbios tales como bacterias de ácido láctico se han informado con anterioridad. Por ejemplo, el Documento no de Patente 1 informa que cuando se alimenta una alimentación que contiene 10% de *Bifidobacterium bifidum* G9-1 seca viva a ratas exógenamente hipercolesterolémicas (ExHC), ratas obesas (Wistar grasos), y ratones obesos y diabéticos (KK-A^y), los niveles de triacilglicerol y colesterol en la sangre y el hígado disminuyeron. Sin embargo, cuando se utiliza la cepa bacteriana anterior, una gran cantidad de las bacterias se debe mezclar en el alimento para obtener los efectos anteriores, y la garantía de la ingestión de rutina y continua de la cantidad eficaz es difícil.

Además, se sabe que el ácido linoleico conjugado (CLA, por su sigla en inglés) presenta actividad fisiológica que incluye una acción contra la obesidad. Por ejemplo, el Documento no de Patente 2 informa un estudio con animales en el que la mezcla de CLA en el alimento en cantidades de 0, 0,25, 0,5 y 1% revelaron que, en cantidades de 0,5% o más, el peso corporal y la grasa corporal se redujeron en una manera dependiente de la concentración.

En relación con el CLA, se sabe que las bacterias tales como las del género *Bifidobacterium* tienen la capacidad de convertir el ácido linoleico (LA) en CLA (función de conversión de CLA), y se han propuesto diversas técnicas que utilizan estas bacterias. Por ejemplo, el Documento de Patente 1 describe que todas de la *Bifidobacterium breve* CBG-C2, la *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CBG-C4 y la *Enterococcus faecium* CBG-C5 exhiben una funcionalidad de conversión de CLA superior, y la Tabla 1 describe que la *Bifidobacterium breve* CBG-C2 convirtió LA en CLA con una tasa de conversión de CLA alta de 54,7%. Además, el Documento de Patente 1 también describe el uso de composiciones de generación de CLA que comprenden estas cepas bacterianas como componentes activos en la prevención o el tratamiento de enfermedades que son inhibidas por CLA (tales como el cáncer, la esclerosis arterial, la diabetes y la obesidad).

Sin embargo, cuando el CLA o las bacterias que tienen una función de conversión de CLA superior se administran como parte de una dieta destinada a ya sea el tratamiento de la obesidad o la prevención de la obesidad, existe el peligro de que se produzcan efectos secundarios.

Como ejemplo de estos efectos secundarios de CLA, el Documento no de Patente 3 informa que cuando el 1% de CLA se mezcló con ratones alimentados y administrados durante un período de 8 meses, se observaron una atrofia del tejido adiposo, un incremento en el nivel de insulina, y una reducción en la tolerancia a la glucosa. Además, el Documento no de Patente 4 informa que cuando los seres humanos ingieren aproximadamente 3 g de CLA al día durante un período continuo, la tolerancia a la glucosa tiende a empeorar, de acuerdo con lo evidenciado por una disminución en la sensibilidad a la insulina y un incremento de los marcadores de oxidación en la orina.

Además, la cantidad promedio de la ingestión de LA por los japoneses es aproximadamente 11 g (véase el Documento no de Patente 5), y por lo tanto si se administran bacterias que tienen una alta función de conversión de CLA, el CLA se producirá en grandes cantidades. Por ejemplo, si 11 g de LA se convierten en CLA con la tasa de conversión mencionada con anterioridad de 54,7%, entonces se producirán 6,02 g de CLA. Si una gran cantidad de CLA se produce de esta manera, a continuación, los efectos secundarios mencionados con anterioridad se convierten en una preocupación.

Por otra parte, el Documento no de Patente 6 discute los papeles antihipertensivos de los probióticos a través de la mejora y/o el tratamiento de los perfiles de lípidos, la modulación de la resistencia a la insulina y la sensibilidad, la modulación de los niveles de renina y también la conversión de los fitoestrógenos bioactivos como un reemplazo alternativo de las hormonas sexuales tales como el estrógeno y la progesterona.

El Documento de Patente 2 se refiere al uso de bacterias probióticas capaces de promover el desarrollo de una microbiota intestinal bifidogénica temprana en la fabricación de un medicamento o una composición nutricional terapéutica para la reducción del riesgo de desarrollo de sobrepeso u obesidad de un niño más adelante en la vida.

Lista de Referencias

Documentos de Patente

[Documento de Patente 1] Traducción Japonesa Publicada Núm. 2005 a 522.216 de PCT

[Documento de Patente 2] Solicitud de patente europea EP-A-1 974 734

Documentos no de Patente

[Documento no de Patente 1] "Effects of bifidobacteria on obese and diabetic animal models", Igáku no ayumi [Avances en Medicina], 205 (4), 273 a 274 (2003)

[Documento no de Patente 2] "Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake", The American Journal of Physiology, 276, 1172 a 1179 (1999)

[Documento no de Patente 3] "Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice", DIABETES, 49, 1534 a 1541 (2000)

[Documento no de Patente 4] "Effects of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men", The American Journal of Clinical Nutrition, 80, 279 a 283 (2004)

[Documento no de Patente 5] "The current state of linoleic acid ingestion", Shishitsu Eiyougaku [Lipid Nutrition], 11, 25 a 31 (2002)

[Documento no de Patente 6] "The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens", International Journal of Molecular Sciences, 10 (9), 3755 a 3775 (2009)

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

La presente invención toma las circunstancias anteriores en consideración, con el objetivo de proporcionar un agente contra la obesidad y un agente de mejora de la tolerancia a la glucosa que son eficaces para la prevención o el tratamiento de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa y también exhiben seguridad superior, así como también de proporcionar alimentos o bebidas que contienen estos agentes.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de una intensa investigación, los inventores de la presente invención descubrieron que *Bifidobacterium breve*, que exhibe una tasa de conversión baja en ácido linoleico conjugado, tiene una acción contra la obesidad y una acción de mejora de la tolerancia a la glucosa que son independientes del ácido linoleico conjugado, y sobre la base de este hallazgo, fueron capaces de completar la presente invención.

Con el fin de lograr el objetivo descrito con anterioridad, la presente invención adopta las formas que se describen a continuación.

(1) Una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175).

(2) Una composición farmacéutica que comprende la cepa bacteriana de acuerdo con lo definido en el punto (1) y en forma opcional un portador aceptable para uso farmacéutico.

(3) Un alimento o una bebida o producto nutricional que comprende la cepa bacteriana de acuerdo con lo definido en el punto (1).

(4) Una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175) para su uso en el tratamiento contra la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa.

(5) La cepa bacteriana de acuerdo con el punto (4), en el que la cepa bacteriana es para ser administrada en forma de una composición farmacéutica, un alimento, una bebida o un producto nutricional.

(6) El uso de una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175) para la producción de una composición para el tratamiento de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa.

(7) El uso de acuerdo con el punto (6), en el que la composición se selecciona del grupo que consiste en una composición farmacéutica, un alimento, una bebida y un producto nutricional.

(8) Una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175) y en forma opcional un portador aceptable para uso farmacéutico, en la que la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento contra la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa.

Efecto de la invención

La presente invención es capaz de proporcionar un agente contra la obesidad y un agente de mejora de la tolerancia a la glucosa que son eficaces para la prevención o el tratamiento de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa y también exhiben seguridad superior, así como también es capaz de proporcionar alimentos o bebidas que contienen estos agentes. Además, la presente invención también es capaz de proporcionar una *Bifidobacterium breve* que es eficaz para la prevención o el tratamiento de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa o la resistencia a la insulina y también exhibe una seguridad superior, así como también una composición farmacéutica que contiene esta bacteria.

Breve Descripción de las Figuras

La FIG. 1 es un gráfico que ilustra las tendencias de incremento de peso corporal para un grupo de control y un grupo de administración de *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 en el ejemplo de prueba 2.

La FIG. 2 es un gráfico que ilustra las tendencias de incremento de peso corporal para un grupo de control y un grupo de administración de *Bifidobacterium breve* MCC 1274 en el ejemplo de prueba 2.

La FIG. 3 es un gráfico que ilustra los resultados de la medición del peso de tejido adiposo del epidídimo en el ejemplo de prueba 2.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra los resultados de la medición del valor de la Evaluación del Modelo de Homeostasis de la Resistencia a la Insulina (HOMA-IR, por su sigla en inglés) en el ejemplo de prueba 2.

Formas de realización para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a una cepa bacteria que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175).

La *Bifidobacterium breve* (en adelante abreviada con frecuencia como "*B. breve*"), perteneciente al género *Bifidobacterium* que se utiliza en la presente invención es una *B. breve* para el cual la tasa de conversión de ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA) (en lo sucesivo también denominada como la "tasa de conversión de CLA"), determinado de acuerdo con el procedimiento que se describe a continuación, no es más de 10%.

Las células bacterianas de la *B. breve* anteriores se suspenden a una concentración de 2 x 10^7 CFU/ml en un medio líquido que contiene una concentración añadida de LA de 500 µg/ml, y después de la incubación durante 48 horas a 37 ºC, se mide la cantidad de CLA producida, y la tasa de conversión de CLA (%) se determina a partir de la siguiente fórmula.

Tasa de conversión (%) = (cantidad de CLA producido / cantidad de LA añadido) x 100

La "cantidad de CLA producido" mencionada con anterioridad se puede medir, por ejemplo, por el uso del procedimiento descrito a continuación.

En primer lugar, después de las 48 horas de incubación, el medio líquido anterior se somete a una separación centrífuga.

El sobrenadante se recupera, un volumen de alcohol isopropílico que es el doble que el del sobrenadante se añade al sobrenadante y se mezcla, un volumen de hexano de 1,5 veces el del sobrenadante se añade entonces a la mezcla, y después de mezclar durante 3 minutos, la mezcla se deja decantar y se recupera la capa de hexano. La absorbancia de la capa de hexano a 233 nm se mide, y se basa en una comparación con los materiales estándar (ácido linoleico conjugado cis-9, trans-11), se determina la concentración de CLA (µg/ml) dentro de la capa de hexano y se calcula la cantidad de CLA (µg) contenida en el sobrenadante anterior.

Mientras tanto, al residuo dejado después de la recuperación del sobrenadante se añade y se mezcla una cantidad de agua destilada 5 veces la del residuo, para formar de ese modo una suspensión. Se añade un volumen de alcohol isopropílico que es el doble que el de la suspensión a la suspensión y se mezcla, un volumen de hexano de 1,5 veces el de la suspensión se añade luego a la mezcla, y después de mezclar durante 3 minutos, la mezcla se deja sedimentar y la capa de hexano se recupera. La concentración de CLA (µg/ml) dentro de la capa de hexano se determina de la misma manera que la descrita con anterioridad, y se calcula la cantidad de CLA (µg) contenida en el residuo.

El total de las cantidades de CLA contenidas en el sobrenadante y el residuo se registra como la "cantidad de CLA producido".

El medio líquido puede ser cualquier medio capaz de cultivar *B. breve*, y se puede seleccionar de manera apropiada a partir de medios líquidos convencionales. Los ejemplos específicos incluyen el medio MRS (de Man Rogosa Sharpe), ABCM (Medio de Cultivo para Bacterias Anaerobias) y medio RCA (Agar Reforzado para Clostridios).

La descripción anterior describe un ejemplo en el que el ácido linoleico conjugado cis-9, trans-11 se utiliza como el material estándar, pero las cantidades calculadas de CLA son sustancialmente las mismas incluso si se utiliza un isómero diferente, tal como ácido linoleico conjugado trans-10, cis-12.

La tasa de conversión de CLA es un indicador de la magnitud de la función de conversión de CLA (la capacidad de convertir LA en CLA) poseída por la *B. breve*.

B. breve que exhibe una tasa de conversión de CLA de no más de 10% (en adelante también denominado como "*B. breve* de baja conversión de CLA") tiene una acción contra la obesidad que no depende de CLA.

Una "acción contra la obesidad" describe una acción que previene o mejora la obesidad por medio de la supresión de la ganancia de peso y/o la supresión de los incrementos en la grasa corporal.

En la presente invención, el término "obesidad" se refiere no sólo al simple estado de tener un peso corporal grande, sino también a un estado en el que la proporción de tejido adiposo entre los componentes estructurales del cuerpo es anormalmente grande.

En los últimos años se ha informado de que, en términos de la acumulación de grasa subcutánea y la grasa visceral, la obesidad de grasa visceral, en la que la grasa se acumula entre los órganos, es más probable que se asocie con enfermedades de adultos tales como la hipertensión arterial, la hiperlipidemia y la diabetes que la obesidad grasa subcutánea, en la que la grasa se acumula dentro del tejido subcutáneo. De acuerdo con lo ilustrado en el ejemplo de prueba 2 a continuación, la *B. breve* de baja conversión de CLA tiene un efecto inhibidor sobre el incremento de peso corporal y, en particular, tiene un efecto inhibidor sobre la acumulación de grasa visceral. En consecuencia, los alimentos y las bebidas que contienen el agente contra la obesidad y el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención son eficaces en la prevención y el tratamiento de las enfermedades anteriores.

Además, debido a la *B. breve* de baja conversión de CLA tiene una capacidad limitada para convertir LA en CLA, hay peligro mínimo de los efectos secundarios provocados por CLA tal como la atrofia del tejido adiposo, el incremento en el nivel de insulina, y la reducción en la tolerancia a la glucosa. En otras palabras, si, de acuerdo con lo descrito en el Documento no de Patente 5 mencionado con anterioridad, la cantidad promedio de la ingestión de LA por los japoneses es de aproximadamente 11 g, y la tasa de conversión de CLA es alta, entonces LA se convierte en CLA *in vivo*, y existe un peligro considerable de efectos secundarios provocados por CLA, pero debido a que la *B. breve* utilizada en la presente invención tiene una baja tasa de conversión de CLA, se supuso que los efectos secundarios provocados por CLA no se producirán, por lo que el tratamiento es extremadamente seguro.

Por consiguiente, el agente contra la obesidad de la presente invención puede ser ingerido con seguridad, y por medio de la combinación del agente contra la obesidad con un alimento o una bebida, y luego la administración de una cantidad eficaz del alimento o la bebida a un paciente obeso o un ser humano sano o animal doméstico que está en necesidad de hacer dieta, ya sea sobre una base de día a día o durante un período prolongado, si es necesario, se puede llevar a cabo una acción contra la obesidad.

Además, la *B. breve* con baja conversión de CLA no provoca la tolerancia anormal a la glucosa, que es uno de los efectos secundarios conocidos de CLA, y de acuerdo con lo ilustrado en el ejemplo de prueba 2 a continuación, de hecho tiene una acción de mejora de la tolerancia a la glucosa y una acción de mejora de la resistencia a la insulina.

Por consiguiente, el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención se puede ingerir con

seguridad, y por medio de la combinación del agente de mejora de la tolerancia a la glucosa en un alimento o una bebida, y luego la administración de una cantidad eficaz del alimento o la bebida a un paciente diabético o un ser humano saludable o un animal doméstico que está en necesidad de mejora de la tolerancia a la glucosa, ya sea sobre una base de día a día o durante un período prolongado si se requiere, se pueden llevar a cabo una acción de mejora de la tolerancia a la glucosa y una acción de mejora de la resistencia a la insulina.

La *B. breve* de baja conversión de CLA que se utiliza en la presente invención incluye la cepa *B. breve* MCC 1274.

La *B. breve* MCC 1274 es una cepa bacteriana perteneciente al género *Bifidobacterium* que fue adquirida e identificada por los solicitantes de la presente invención por el uso del procedimiento descrito a continuación, y se depositó con el Organismo Depositario Internacional de Patentes del Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología (Central 6, 1-1-1 Higashi, ciudad de Tsukuba, Prefectura de Ibaraki, Japón (código postal: 305-8566)) el 25 de agosto de 2009 (número de acceso: FERM BP-11175).

(Adquisición e Identificación de *B. breve* MCC 1274)

Por el uso de heces de bebé japonés como muestra, la muestra se diluyó con un diluyente anaeróbico (un diluyente descrito en la página 322 de "Chounaikin no Sekai" [*El mundo de las bacterias entéricas]* (por Tomotrui Mitsuoka, publicado por Soubunsha Co., Ltd., 1980), se aplicó a una placa plana de un medio de agar BL (descrito en la página 319 de "Chounaikin no Sekai"), y luego se incubó anaeróbicamente a 37 ºC durante 72 horas. Entre las colonias resultantes, aquellas cepas que exhibieron características morfológicas de una *Bifidobacterium*, fueron Gram positivas, y exhibieron una célula bacteriana en forma de barra, en forma de barra palo o en forma de barra de Y con cuando se observó una muestra aplicada bajo un microscopio y se aplicaron en rayas a un medio de agar BL, y luego se repitió la incubación aeróbica por el uso del mismo método que el descrito con anterioridad para obtener las cepas bacterianas aisladas puras. La cepa de bacterias mencionada con anterioridad se llamó *B. breve* MCC 1274.

Se investigaron las propiedades bacteriológicas de *B. breve* MCC 1274, que incluyen la forma de las células, la motilidad, la formación de esporas, la tinción de Gram, la actividad de catalasa, la producción de gas a partir de glucosa, y la fermentación de azúcares. La evaluación de la fermentación de azúcares se llevó a cabo por el uso de un kit API 50CH (fabricado por bioMérieux, Japón), con determinaciones hechas de acuerdo con el método descrito en el manual proporcionado con el kit. En otras palabras, después de la incubación hasta el día siguiente, el líquido bacteriano se utilizó para inocular cada uno de los sustratos, los sustratos se incubaron luego a 37 ºC dentro de una caja de guantes anaerobia, y en el séptimo día de incubación, se determinó el estado de fermentación de azúcar de cada uno de los sustratos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Propiedades bacteriológicas de *Bifidobacterium breve* MCC 1274

		MCC 1274
1	forma de la célula	Barra pleomórfica
2	Motilidad	Ninguna
3	Formación de esporas	Ninguna
4	Tinción de Gram	Positivo
5	Actividad de catalasa	-
6	Producción de gas a partir de glucosa	-

7	Fermentación de azúcares	
	(1) Control	-
	(2) Glicerol	-
	(3) Eritritol	-
	(4) D-arabinosa	±
	(5) L-arabinosa	-
	(6) Ribosa	+
	(7) D-xilosa	-
	(8) L-xilosa	-
	(9) Adonitol	-
	(10) β-Metil-xilósido	-
	(11) Galactosa	+
	(12) D-Glucosa	+
	(13) D-Fructosa	+
	(14) D-Manitol	+
	(15) L-Sorbosa	-
	(16) Ramnosa	-
	(17) Dulcitol	-
	(18) Inositol	-
	(19) Manitol	+
	(20) Sorbitol	+
	(21) α-Metil-D-manosa	±
	(22) α-Metil-D-glucosa	+
	(23) N-acetilglucosamina	+
	(24) Amigdalina	+
	(25) Arbutina	+
	(26) Esculina	+
	(27) Salicina	+
	(28) Celobiosa	+
	(29) Maltosa	+
	(30) Lactosa	+
	(31) Melibiosa	+
	(32) Sacarosa	+
	(33) Trehalosa	+
	(34) Inulina	-
	(35) Melecitosa	+

	(36) D-Rafinosa	+
	(37) Amidon	+
	(38) Glucógeno	-
	(39) Xilitol	+
	(40) ß-Gentiobiosa	+
	(41) D-Turanosa	+
	(42) D-Lixosa	-
	(43) D-Tagatosa	-
	(44) D-Fucosa	-
	(45) L-Fucosa	+
	(46) D-Arabitol	-
	(47) L-Arabitol	-
	(48) Gluconato	-
	(49) 2-ceto-gluconato	-
	(50) 5-ceto-gluconato	±

Posteriormente, con el fin de investigar las características genéticas de *B. breve* MCC 1274, la secuenciación de base genética de ARNr 16S de la cepa bacteriana anterior se identificó por el uso de métodos convencionales. La determinación de la secuencia de base genética de ARNr 16S de *B. breve* MCC 1274 por el uso del análisis de BLAST para llevar a cabo una búsqueda de homología de la secuencia de bases dentro de la base de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, por su sigla en inglés) reveló un 99% de homología con la cepa estándar *B. breve* conocida como *B. breve* CM 1192^{T} que indica que la cepa era una *Bifidobacterium breve*.

Los resultados anteriores confirmaron que *Bifidobacterium breve* MCC 1274 tenía las propiedades bacteriológicas de una *Bifidobacterium breve*, y era una cepa bacteriana perteneciente a la especie *Bifidobacterium breve*.

La *B. breve* de baja conversión de CLA que el agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención incluye como componente activo puede ser ya sea una única cepa bacteriana o dos o más cepas.

Además, el agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención puede estar compuesto únicamente por el componente activo mencionado con anterioridad, o puede ser una composición o composición farmacéutica que contiene el componente activo y otros componentes opcionales, además del componente activo. No hay limitaciones particulares sobre estos componentes opcionales con la condición de que sean aceptables para uso farmacéutico, y se puede incluir cualquiera de los aditivos (tales como los portadores farmacéuticos descritos más adelante) añadidos en forma típica a composiciones farmacéuticas.

La presente invención proporciona la *B. breve* de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de la obesidad, en la que la *B. breve* de acuerdo con la presente invención se ha de administrar, en una cantidad que es eficaz en el tratamiento o la prevención de la obesidad, a un sujeto que requiere un tratamiento o una prevención de la obesidad.

Además, la presente invención también proporciona la *B. breve* de acuerdo con la invención para su uso en la mejora de la tolerancia a la glucosa, en la que la *B. breve* de acuerdo con la presente invención se ha de administrar, en una cantidad que es eficaz en la mejora de la tolerancia a la glucosa, a un sujeto que requiere una mejora de la tolerancia a la glucosa.

En esta descripción, el término "tratamiento" de la obesidad se refiere a la administración del agente contra la obesidad de la presente invención con el propósito de reducir o mantener el peso corporal de un sujeto. Un resultado posible de este tratamiento puede ser una reducción del peso corporal del sujeto en comparación con el peso corporal del sujeto inmediatamente antes del inicio de la administración del agente contra la obesidad de la presente invención. Además, otro posible resultado del tratamiento puede ser una supresión del incremento en el peso corporal del sujeto en comparación con el incremento del peso corporal del sujeto inmediatamente antes del inicio de la administración del agente contra la obesidad de la presente invención.

Por otra parte, el término "prevención" de la obesidad se refiere a la administración del agente contra la obesidad de la presente invención con el propósito de reducir o mantener el peso corporal de un sujeto en riesgo de obesidad. Un posible resultado de esta prevención puede implicar el mantenimiento o la reducción del peso corporal del "sujeto en riesgo de obesidad" en comparación con el peso corporal del sujeto inmediatamente antes del inicio de la administración del agente contra la obesidad de la presente invención. Además, otro posible resultado de la prevención puede ser una supresión del incremento del peso corporal del sujeto en comparación con el incremento del peso corporal del sujeto inmediatamente antes del inicio de la administración del agente contra la obesidad de la presente invención.

En esta descripción, el término "mejora" de la tolerancia a la glucosa se refiere a la administración del agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención con el fin de mantener o mejorar la tolerancia a la glucosa de un sujeto. Un posible resultado de esta mejora de la tolerancia a la glucosa puede implicar el mantenimiento o la mejora de la tolerancia a la glucosa del sujeto en comparación con la tolerancia a la glucosa del sujeto inmediatamente antes del inicio de la administración del agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención. Además, otro posible resultado de la prevención puede ser una supresión del incremento del peso corporal del sujeto en comparación con el incremento del peso corporal del sujeto inmediatamente antes del inicio de la administración del agente contra la obesidad de la presente invención.

El término "administración" del agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa, o "administrar" el agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa describe la entrega del agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención a un sujeto que requiere un tratamiento, una prevención o una mejora.

En esta descripción, un "sujeto" que requiere un tratamiento, una prevención o una mejora es un animal que es el objeto de un tratamiento, una prevención, una mejora, una observación o un experimento, y con preferencia es un mamífero, y con mayor preferencia un ser humano.

Un "sujeto" que requiere un tratamiento, una prevención o una mejora describe un sujeto que requiere un método de tratamiento, de prevención o de mejora prescrito por un investigador, un veterinario, un doctor en medicina u otro profesional de la salud.

La vía de administración del agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención puede ser ya sea oral o parenteral, pero con preferencia es oral. Los ejemplos de administración parenteral incluyen la administración transrectal y similares.

No hay limitaciones particulares sobre la dosis del agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención, y la dosis se puede determinar de manera apropiada de acuerdo con el efecto contra la obesidad o el efecto de mejora de la tolerancia a la glucosa deseado, con la debida consideración de la acción contra la obesidad o la acción de mejora de la tolerancia a la glucosa de la *B. breve* de baja conversión de CLA utilizada y la vía de administración.

Por ejemplo, en aquellos casos donde *B. breve* MCC 1274 y, en forma opcional, *B. breve* ATCC 15700 se utiliza como el componente activo y la administración se lleva a cabo por vía oral, la dosis diaria usual que es eficaz para el tratamiento o la prevención de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa, calculada como el recuento de bacterias por 1 kg de peso corporal (CFU/kg de peso corporal), con preferencia es de $1x10^6$ CFU/kg de peso corporal o más, y con mayor preferencia es de $1x10^8$ CFU/kg o mayor.

El agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención se pueden administrar en una dosis diaria única, o se puede administrar en una pluralidad de ocasiones.

El agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención se pueden producir en cualquier forma de dosificación predeterminada de acuerdo con el método de administración que se utiliza.

Los ejemplos de la forma de dosificación del agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención, en el caso de la administración oral, incluyen formulaciones sólidas tales como polvos, gránulos, comprimidos y cápsulas, y formulaciones líquidas tales como jarabes, suspensiones y emulsiones. Además, en el caso de la administración parenteral, los ejemplos de la forma de dosificación incluyen supositorios, pomadas y aerosoles.

La producción de estas formulaciones se puede llevar a cabo por el uso de métodos convencionales, de acuerdo con la forma de dosificación.

Durante la producción, la formulación puede estar compuesta únicamente por el componente activo, o puede incluir también un portador farmacéutico apropiado.

En aquellos casos en los que se añade un portador farmacéutico, no hay limitaciones particulares sobre la cantidad de mezcla del componente activo dentro del agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la

glucosa de la presente invención, y esta cantidad se puede determinar de manera apropiada de acuerdo con la forma de dosificación, tal como un polvo, un comprimido o una cápsula. El contenido bacteriano en forma típica está dentro de un intervalo de $1x10^6$ a $1x10^{12}$ CFU/g, con preferencia es de $1x10^8$ a $1x10^{12}$ CFU/g, y con mayor preferencia es de 1×10^{10} a $1x\ 10^{12}$ CFU/g.

En cuanto al portador farmacéutico, se puede utilizar cualquier portador orgánico o inorgánico aceptable para uso farmacéutico convencional, dependiendo de la forma de dosificación.

Por ejemplo, en el caso de formulaciones sólidas, los ejemplos del portador incluyen excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, estabilizantes y agentes correctores y similares.

Los ejemplos de los excipientes incluyen derivados de azúcar tales como lactasa, sacarosa, glucosa, manitol y sorbitol, derivados de almidón tales como almidón de maíz, almidón de patata, α-almidón, dextrina y carboximetil almidón, derivados de celulosa tales como celulosa cristalina, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetil celulosa y carboximetilcelulosa de calcio, así como también goma árabe, dextrano, pululano, derivados de silicato tales como ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio sintético y aluminometasilicato de magnesio, derivados de fosfato tales como fosfato de calcio, derivados de carbonato tales como carbonato de calcio, y derivados de sulfato tal como sulfato de calcio.

Los ejemplos de los aglutinantes incluyen, además de los excipientes mencionados con anterioridad, gelatina, polivinilpirrolidona y magrogol.

Los ejemplos de los disgregantes incluyen, además de los excipientes mencionados con anterioridad, almidón o derivados de celulosa modificados químicamente tales como croscarmelosa de sodio, carboximetilalmidón de sodio y polivinilpirrolidona reticulada.

Los ejemplos de los lubricantes incluyen talco, ácido esteárico, estearatos metálicos tales como estearato de calcio y estearato de magnesio, sílice coloidal, ceras tales como goma de abejas y cera de esperma de ballena, ácido bórico, glicol, ácidos carboxílicos tales como ácido fumárico y ácido adípico, carboxilatos de sodio tales como benzoato de sodio, sulfatos tales como sulfato de sodio, leucina, lauril sulfatos tales como lauril sulfato de sodio y lauril sulfato de magnesio, silicatos tales como anhídrido de ácido silícico e hidrato de ácido silícico, y derivados de almidón.

Los ejemplos de los estabilizadores incluyen ésteres de ácido para-hidroxibenzoico tales como metilparabeno y propilparabeno, alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico y alcohol feniletílico, cloruro de benzalconio, anhídrido acético y ácido sórbico.

Los ejemplos de los agentes correctivos incluyen edulcorantes, acidulantes y aromas.

En el caso de formulaciones líquidas para la administración oral, los ejemplos del portador incluyen solventes tales como agua, y agentes correctivas.

El agente contra la obesidad o el agente de mejora de la tolerancia a la glucosa de la presente invención se pueden añadir a cualquiera de los diversos productos farmacéuticos, productos alimenticios o productos nutricionales o similares.

Un alimento o una bebida contra la obesidad de la presente invención contiene el agente contra la obesidad de la presente invención descrito con anterioridad. Por medio de la ingestión del alimento o la bebida contra la obesidad, se obtiene un efecto similar al conseguido por medio de la administración del agente contra la obesidad de la presente invención.

El alimento o la bebida contra la obesidad de la presente invención también es eficaz para estar en forma o hacer dieta por medio de la supresión de los incrementos en la grasa corporal o la reducción de la grasa corporal.

Si bien no hay limitaciones particulares sobre la cantidad del agente contra la obesidad dentro del alimento o la bebida contra la obesidad de la presente invención, se prefiere una cantidad que permita una dosis diaria de la *B. breve* de baja conversión de CLA que proporciona un efecto eficaz contra la obesidad para ser ingerido sin ninguna dificultad en particular, y la cantidad de la *B. breve* de baja conversión de CLA en forma típica está dentro de un intervalo de $1x10^6$ a $1x10^{12}$ CFU/g, con preferencia es de $1x10^8$ a $1x10^{12}$ CFU/g, y con mayor preferencia es de $1x10^{10}$ a $1x10^{12}$ CFU/g.

El alimento o la bebida contra la obesidad de la presente invención se puede producir por el uso del agente contra la obesidad y otros componentes aceptables para su inclusión dentro de los alimentos y las bebidas como materias primas, o se pueden producir por medio de la adición del agente contra la obesidad de la presente invención a un alimento o una bebida existente que contiene otros componentes.

Por ejemplo, si el alimento o la bebida contra la obesidad de la presente invención es un producto de leche fermentada, a continuación, el alimento o la bebida contra la obesidad se puede producir por medio de la adición de la *B. breve* de baja conversión de CLA de acuerdo con la invención a una leche fermentada, o puede ser una leche fermentada producida por el uso de la *B. breve* de baja conversión de CLA de acuerdo con la invención como un

iniciador.

No hay limitaciones particulares sobre los demás componentes incluidos en el alimento o la bebida, con la condición de que los componentes hayan sido aprobados para su adición a los alimentos y las bebidas en las regulaciones de alimentos, tal como la Ley de Higiene Alimentaria, y no perjudiquen la acción contra la obesidad. Los ejemplos de componentes que se pueden incluir dentro del alimento o la bebida incluyen azúcares tales como dextrina y almidón, proteínas tales como gelatina, proteína de soja y proteína de maíz, aminoácidos tales como alanina, glutamina e isoleucina, polisacáridos tales como celulosa y goma árabe, y aceites y grasas tales como aceite de soja y triglicéridos de ácidos grasos de cadena media.

No hay limitaciones particulares sobre la forma del alimento o la bebida, que incluye cualquier forma de composición comestible compuesta de la *B. breve* de baja conversión de CLA de acuerdo con la invención y un portador que es aceptable para su inclusión dentro de alimentos y bebidas. Los ejemplos específicos incluyen todo tipo de formas de alimentos y bebidas, que incluyen alimentos sólidos tales como pan, goma de mascar, galletas, chocolate, productos de confitería y cereales, los alimentos a base de mermelada, a base de crema y a base de gel, tales como mermelada, helado, yogur y jalea, y bebidas tales como zumos, café y cacao. Además, la *B. breve* de baja conversión de CLA de acuerdo con la invención también se puede añadir a los aromas y aditivos alimentarios y similares.

En aquellos casos donde el alimento o la bebida contra la obesidad de la presente invención es un producto de leche fermentada producido por el uso de la *B. breve* de baja conversión de CLA de acuerdo con la invención como un iniciador, la *B. breve* de baja conversión de CLA se puede utilizar sola durante la fermentación, o se puede llevar a cabo una incubación de mezclado por el uso de la *B. breve* de baja conversión de CLA y otro iniciador.

Los ejemplos de estos otros iniciadores incluyen aquellos iniciadores que se utilizan en forma típica en la producción de productos lácteos fermentados, tales como otras bacterias del género *Bifidobacterium* (tales como las *Bifidobacterias*: *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. adolescentis*), y otras bacterias de ácido láctico convencionales que se utilizan en forma típica como iniciadores para productos lácteos fermentados. Los ejemplos específicos de estas bacterias de ácido láctico incluyen *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus gasseri*.

La leche fermentada se puede producir por el uso de un método convencional. Un ejemplo de un método para la producción de una leche fermentada se describe a continuación.

En primer lugar, se prepara una mezcla de materias primas que contiene la leche de materia prima. Además de la leche de materia prima, la mezcla de materia prima también puede contener otros componentes tales como aceites y grasas, azúcares y agua, de acuerdo con las necesidades. Por ejemplo, una materia prima que contiene grasa como la mantequilla o crema se puede añadir como un componente de grasa. Los ejemplos de azúcares que se pueden añadir incluyen edulcorantes típicos tales como sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa, dextrina y maltosa reducida. En aquellos casos en los que se ha de producir un yogur duro, se puede añadir gelatina pre-hinchada y/o una solución de agar disuelto. En aquellos casos en los que se ha de producir un yogur suave, se puede añadir una proteína de suero y/o un espesante de polisacárido. En aquellos casos en los que se ha de producir un yogur de bebida, se puede añadir pectina de alto metoxilo en una cantidad de 0 a 0,3% en masa como un estabilizador, si bien se prefiere que no se añada ninguna pectina de alto metoxilo.

No hay limitaciones particulares sobre el método utilizado para la producción de la mezcla de materias primas, y por ejemplo, se pueden añadir los otros componentes que se incluyen de acuerdo con la necesidad a la leche de materia prima, y la mezcla resultante se agita y se mezcla para obtener la mezcla de materias primas.

La relación de mezcla de la leche de materia prima dentro de la mezcla de materia prima, calculada como una fracción sólida no grasa, con preferencia se encuentra dentro de un intervalo de 1 a 15% en masa, y con mayor preferencia de 8 a 15% en masa.

Posteriormente, la mezcla de materia prima se somete a un tratamiento de esterilización por calor. Si bien no hay limitaciones particulares sobre el método de esterilización o las condiciones de calentamiento, se prefiere una temperatura de calentamiento de 80 a 140 ºC, y el tiempo de calentamiento con preferencia se encuentra dentro de un intervalo de 5 a 15 minutos en el caso de un tratamiento por lotes, o dentro de un intervalo de 2 segundos a 15 minutos en el caso de un método HTST.

La mezcla de materia prima esterilizada por calor es entonces inoculada con las bacterias iniciadoras, y se lleva a cabo la fermentación. Las condiciones de fermentación, que incluyen la cantidad del iniciador que se utiliza para la inoculación, la temperatura de fermentación y el tiempo de fermentación se pueden establecer de manera apropiada de acuerdo con factores tales como el tipo de iniciador empleado, y la variedad y las propiedades del producto de leche fermentada que se produce. Dependiendo de la forma del producto, después de la inoculación con el iniciador, la mezcla se puede colocar dentro de un recipiente para la fermentación, o la fermentación se puede llevar a cabo en un tanque de fermentación.

Después de la fermentación, la mezcla se enfría con rapidez para obtener el producto de leche fermentada.

Dependiendo del tipo de producto y las propiedades del producto, se puede llevar a cabo un paso de homogeneización de los siguientes productos de refrigeración, o un paso de adición de otras materias primas tales como aromatizantes posterior al enfriamiento.

La leche fermentada obtenida a partir de esta manera se puede utilizar, sin esterilización por calor adicional, tal como un producto de tipo de bacterias vivas que permite la ingestión de bifidobacterias *in vivo*. Los productos de tipo de bacterias vivas se almacenan, se transportan y se comercializan a una baja temperatura de no más de 10 ºC, y con preferencia una temperatura de 0 a 5 ºC.

El alimento o la bebida contra la obesidad de acuerdo con la presente invención con preferencia se comercializan en forma de un alimento o una bebida que indica su uso para aplicaciones contra la obesidad, por ejemplo por medio del empleo de la expresión "contra la obesidad" o "alimento (o bebida) que tiene un efecto contra la obesidad".

Se debe señalar que la expresión que se utiliza para el tipo de indicación que se ha descrito con anterioridad no se limita a la frase "contra la obesidad", y de más está decir, cualesquiera otras expresiones que indican un efecto contra la obesidad también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos de tales otras expresiones pueden incluir "efecto de prevención contra la obesidad", "efecto de mejora de la obesidad", "efecto de supresión del incremento de peso ", "efecto de supresión de incremento de la grasa corporal" o "efecto dietético", y el alimento o la bebida se pueden comercializar con una o más de estas expresiones indicadas en el producto.

Además, de una manera similar, el alimento o la bebida también se puede comercializar como un alimento o una bebida que indica su uso en la prevención y/o la mejora de enfermedades de estilo de vida para los que la obesidad es una causa conocida, tales como la hiperlipidemia, la hipertensión arterial y la diabetes.

El alimento o la bebida para mejorar la tolerancia a la glucosa de acuerdo con la presente invención se comercializan con preferencia en forma de un alimento o una bebida que indica abiertamente su uso para la mejora de la tolerancia a la glucosa, por ejemplo por medio del empleo de la expresión "para la mejora de la tolerancia a la glucosa" o "alimento (o bebida) que tiene un efecto de mejora de la tolerancia a la glucosa".

Se debe señalar que la expresión que se utiliza para el tipo de indicación que se ha descrito con anterioridad no se limita a la frase "para la mejora de la tolerancia a la glucosa", y de más está decir, cualesquiera otras expresiones que indican un efecto de mejora de la tolerancia a la glucosa también se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

Además, de una manera similar, el alimento o la bebida también se pueden comercializar como un alimento o una bebida que indica su uso en la prevención y/o la mejora de enfermedades de estilo de vida para los que una reducción de la tolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina es una causa conocida, tal como la diabetes y otras enfermedades de estilo de vida.

La acción asociada con el término anterior "indicar" incluye todas las acciones para informar a los consumidores acerca del uso que se ha descrito con anterioridad, y cualquier exhibición que recuerde a los consumidores del uso que se ha descrito con anterioridad o permita a los consumidores reconocer el uso que se ha descrito con anterioridad por analogía cae dentro del alcance de la "indicación", de acuerdo con la presente invención, con independencia de la finalidad de la indicación, el contenido de la indicación, o un objetivo o medio o similar de la indicación. Sin embargo, la indicación con preferencia se da por el uso de una expresión que permite a los consumidores reconocer directamente el uso mencionado con anterioridad. Los ejemplos específicos de la indicación incluyen acciones para indicar el uso mencionado con anterioridad en productos comerciales relacionados con el alimento o la bebida de acuerdo con la presente invención o los paquetes de los productos comerciales, las acciones de la asignación, entrega, exhibición con el fin de asignar o entregar, o importar los productos comerciales o paquetes de los mismos con una indicación que indique el uso descrito con anterioridad, y acciones que indiquen el uso descrito con anterioridad en anuncios, listas de precios o documentos comerciales relacionados con los productos mostrándolos o distribuyéndolos, o indicando el uso dentro de la información que incluye dichos anuncios, listas de precios o documentos comerciales y proporcionando esa información por medio de un método electromagnético (tal como Internet).

El contenido de la indicación (contenido indicado) con preferencia está aprobado por el gobierno o similar del país del cual que se trate (por ej., una indicación de un formulario basado en una aprobación concedida sobre la base de cualquiera de los diversos sistemas establecidos por el gobierno de ese país), y dicho contenido indicado con preferencia está unido a envases, recipientes, catálogos, soportes publicitarios utilizados en los sitios de ventas, tales como folletos y publicidades, y otros documentos.

Además, otros ejemplos de la indicación incluyen indicaciones como un alimento de salud, alimentos funcionales, alimentos enterales, alimentos para uso dietético especial, alimentos con reivindicaciones de salud, alimentos para usos de salud especificados, alimentos con reivindicaciones funcionales de nutrientes, y cuasi-fármacos. En particular en el caso de Japón, otros ejemplos incluyen las indicaciones aprobadas por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, tales como las indicaciones aprobadas con base en el sistema de alimentos para usos sanitarios especificados y otros sistemas similares. Los ejemplos de estos últimos incluyen las indicaciones como alimento para usos sanitarios especificados, las indicaciones como alimento cualificado para usos sanitarios

especificados, las indicaciones de influencia en las estructuras o funciones del cuerpo, y las indicaciones de reducción en el riesgo de enfermedad. En forma más específica, los ejemplos típicos de los mismos incluyen indicaciones como alimentos para usos de salud especificados (en especial, indicaciones de uso para la salud) prescritas en las normas de aplicación de la Ley de Promoción de la Salud (Ordenanza Ministerial Núm. 86, Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar, Japón, 30 de abril de 2003) e indicaciones similares.

Ejemplos

La presente invención se describe con más detalle a continuación por medio de una serie de ejemplos de prueba y ejemplos, pero la presente invención de ningún modo está limitada por los siguientes ejemplos.

<Ejemplo de Prueba 1: Medición de la tasa de conversión de CLA>

Las células bacterianas de *B. breve* (MCC 1274 o ATCC 15700) a una concentración de $2x10^7$ CFU/ml se suspendieron en un caldo de medio MRS (MRS (de Man Rogosa Sharpe), un producto Difco (marca registrada), fabricado por Becton Dickinson and Company) que contiene una concentración añadida de LA de 500 µg/ml, y el medio se incubó a continuación durante 48 horas a 37 ºC.

Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se añadió un volumen de alcohol isopropílico que era el doble que el del sobrenadante al sobrenadante y se mezcló, a continuación se añadió un volumen de hexano de 1,5 veces el del sobrenadante a la mezcla, y después de mezclar durante 3 minutos, la mezcla se dejó sedimentar y se recuperó la capa de hexano. Se midió la absorbancia de la capa de hexano a 233 nm, y por el uso de una curva de calibración preparada por el uso de materiales estándar (ácido linoleico conjugado cis-9, trans-11), se determinó la concentración de CLA (µg/ml) dentro de la capa de hexano y se calculó la cantidad de CLA (µg) contenida en el sobrenadante con anterioridad.

Mientras tanto, se añadió y se mezcló una cantidad de agua destilada 5 veces la del residuo al residuo que quedó después de la recuperación del sobrenadante, para formar de ese modo una suspensión. Se añadió un volumen de alcohol isopropílico que era el doble que el de la suspensión a la suspensión y se mezcló, después se añadió un volumen de hexano de 1,5 veces el de la suspensión a la mezcla, y después de mezclar durante 3 minutos, la mezcla se dejó sedimentar y se recuperó la capa de hexano. Se determinó la concentración de CLA (µg/ml) dentro de la capa de hexano de la misma manera que la descrita con anterioridad, y se calculó la cantidad de CLA (µg) contenida dentro el residuo.

El total de las cantidades de CLA contenidas en el sobrenadante y el residuo se registró como la "cantidad de CLA producido", y la tasa de conversión (%) de LA en CLA se determinó a partir de la fórmula a continuación. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tasa de conversión (%) = (cantidad de CLA producido / cantidad de LA añadido) x 100

De acuerdo con lo mostrado por los resultados a continuación, las dos cepas (MCC 1274 y ATCC 15700) exhibieron tasas de conversión de CLA de 10% o menos.

[Tabla 2]

	Tasa de conversión de CLA (%)
MCC 1274	10,0
ATCC 15700 (referencia)	5,0

<Ejemplo de Prueba 2: Investigación de los Efectos de la Administración de *B. breve* de Baja Conversión de CLA a Modelo de Ratón que tiene Obesidad Inducida por la Dieta>

Se utilizaron 18 C57BL/6J macho, con 6 ratones agrupados en cada uno de tres grupos. Después de la administración de una dieta 45% alta en grasas durante un período de 4 semanas para que los ratones se volvieran obesos, una leche en polvo desnatada al 10% se mezcló con la alimentación de un grupo de control, una leche en polvo desnatada al 10% que contenía la cepa bacteriana MCC 1274 suspendida en la misma se mezcló con la alimentación de un grupo de administración de MCC 1274, y una leche en polvo desnatada al 10% que contenía la cepa bacteriana ATCC 15700 suspendida en la misma se mezcló con la alimentación de un grupo de administración de ATCC 15700 (referencia), y cada grupo fue alimentado por otras 8 semanas adicionales. En este momento, la cantidad de la MCC 1274 o ATCC 15700 añadida a la leche en polvo por medio de suspensión en la misma se estableció de manera tal que la cantidad de la *B. breve* ingerida por día fuera de aproximadamente 1 mil millones de bacterias por ratón. Además, como alimento se utilizó un alimento que contenía 22% en masa de ácidos grasos (de los cuales la cantidad de ácido linoleico era aproximadamente 3,1% en masa).

Durante el período de prueba, sólo se midió el peso corporal de cada ratón, y luego después de la finalización de la prueba, los ratones fueron sacrificados y disecados y se midieron el peso corporal y el peso del tejido adiposo del epidídimo.

Las tendencias en cuanto al incremento del peso corporal durante el período de prueba se muestran en la FIG. 1 y la FIG. 2. Los resultados en la FIG. 1 y la FIG. 2 revelan que si bien el peso corporal incrementó en todos los grupos, en comparación con el grupo de control, los 2 grupos que se administraron con MCC 1274 o ATCC 15700 mostraron una supresión significativa del incremento de peso corporal (en comparación con el grupo de control, el peso corporal en los grupos de prueba se redujo en aproximadamente un 18% o más, lo que indica una diferencia significativa a $p < 0,05$).

Además, el peso del tejido adiposo del epidídimo tras la disección se muestra en la FIG. 3. Los resultados en la FIG. 3 revelan un peso de tejido adiposo del epidídimo sobre la disección de 2,66 g para el grupo de control, 2,17 g para el grupo de administración de MCC 1274, y 2,32 g para el grupo de administración de ATCC 15700, lo cual confirma que los incrementos suprimidos por MCC 1274 y ATCC 15700 en el peso adiposo (en comparación con el grupo de control, el peso de tejido adiposo disminuyó en un 18,4% en el grupo MCC 1274 y 12,8% en el grupo de ATCC 15700, que son diferencias significativas a $p <0,05$).

Con base en los resultados anteriores, estaba claro que las cepas bacterianas de *B. breve* MCC 1274 y *B. breve* ATCC 15700 tenían una acción contra la obesidad, que incluye una acción de supresión del incremento del peso corporal y una acción supresión del incremento de la grasa corporal, y en particular, fueron capaces de suprimir los incrementos en (acumulación de) la grasa corporal.

Por otra parte, en el momento de la disección, el nivel de insulina en sangre y el nivel de azúcar en sangre también se midieron por medio de métodos convencionales, y a partir de los valores de medición resultantes, el valor de HOMA-IR, que actúa como un indicador de la resistencia a la insulina, se calculó por el uso de la fórmula numérica (1) a continuación.

Valor de HOMA-IR = nivel de azúcar en sangre (mg/dL) x nivel de insulina en sangre (μIU/ml) ÷ 405 (1)

De acuerdo con lo mostrado en la FIG. 4, los resultados revelaron un valor de 32,10 para el grupo de control, un valor de 11,87 para el grupo de administración de MCC 1274, y un valor de 10,55 para el grupo de administración de ATCC 15700, lo cual confirma que *B. breve* MCC 1274 y ATCC 15700 exhibieron una mejora de la tolerancia a la glucosa y una mejora de la resistencia a la insulina. (una diferencia significativa a $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control).

A partir de los resultados anteriores, era evidente que la *B. breve* no sólo estaba libre de los efectos secundarios asociados con el ácido linoleico conjugado, sino que también mejoró la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina.

De acuerdo con lo indicado por los resultados anteriores, la *B. breve* de baja conversión de CLA que tiene una tasa de conversión de CLA de no más de 10% exhibió una acción contra la obesidad, que incluye una acción de supresión del incremento del peso corporal y una acción de supresión del incremento de la grasa corporal, en ratones con obesidad inducida por la dieta.

En el Ejemplo de Prueba 2 anterior, si se supone que el LA (3,1%) dentro de la alimentación se convirtió en CLA por la *B. breve* de baja conversión de CLA, entonces la cantidad de CLA dentro de la alimentación sería no más de 0,3%. Con el fin de lograr un efecto contra la obesidad o una reducción en la grasa corporal debido a CLA en ratones obesos inducidos por la dieta, por lo menos 0,5% de CLA se debe mezclar con el alimento (véase el Documento no de Patente 5), y teniendo en cuenta este hecho, la *B. breve* de baja conversión de CLA exhibe una acción contra la obesidad que es independiente de CLA.

<Ejemplo 1: Formulación en Polvo (Referencia)>

Un medio de leche en polvo desnatada reconstituida (que contenía 13% en peso de leche en polvo desnatada y 0,5% en peso de un extracto de levadura) se esterilizó a 95 ºC durante 30 minutos. Posteriormente, el medio se inoculó con un cultivo de siembra de *B. breve* ATCC 15700 y después se incubó durante 16 horas a 37 ºC. El producto incubado resultante se liofilizó para obtener una formulación en polvo de *B. breve* ATCC 15700. El recuento bacteriano de *B. breve* ATCC 15700 contenido dentro de la formulación en polvo obtenido fue de $8,5 \times 10^{10}$ CFU/g.

De acuerdo con lo descrito en la presente memoria, esta formulación en polvo se puede utilizar, sin más modificación, dentro de un agente contra la obesidad, un alimento o una bebida contra la obesidad, un agente de mejora de la tolerancia a la glucosa un o alimento o una bebida para la mejora de la tolerancia a la glucosa.

<Ejemplo 2: Formulación en Polvo>

Con la excepción del uso de *B. breve* MCC 1274 en lugar de la *B. breve* ATCC 15700, se preparó una formulación

en polvo de la misma manera que en el Ejemplo 1. El recuento bacteriano de *B. breve* MCC 1274 contenido dentro de la formulación en polvo obtenido fue de $5{,}5x10^{10}$ ºCFU/g.

Esta formulación en polvo se puede utilizar, sin más modificación, dentro de un agente contra la obesidad, un alimento contra la obesidad o una bebida, una agente de mejora de la tolerancia a la glucosa o un alimento o una bebida para la mejora de la tolerancia a la glucosa de acuerdo con la presente invención.

<Ejemplo 3: Yogurt (Referencia)>

Se esterilizaron 1000 ml de una medio de leche en polvo desnatada al 11% (p/p) que contenía 0,5% (p/p) de un extracto de levadura a 90 ºC durante 30 minutos, y luego el medio se inoculó con 100 ml de un cultivo de siembra de *B. breve* ATCC 15700 y se incubó durante 16 horas a 37 ºC.

En una preparación separada, se esterilizaron 1500 ml de un medio de leche desnatada al 10% (p/p) reconstituido a 90 ºC durante 30 minutos, y luego el medio se inoculó con 50 ml de un cultivo mixto de *Streptococcus thermophilus* (fabricado por Chr. Hansen A/S) y *Lactobacillus bulgaricus* (fabricado por Chr. Hansen A/S) y se incubaron durante 5 horas a 42 ºC.

Además, en todavía otra preparación, se calentaron 50 L de una leche cruda que contenía 3,0% (p/p) de grasa de leche y 9% (p/p) de sólidos de leche sin grasa a 70 ºC, se homogeneizaron a una presión de 15 MPa, se esterilizaron a 90 ºC durante 10 minutos, y después se enfriaron a 40 ºC. Esta base esterilizada se inoculó con 750 ml del cultivo de *B. breve* ATCC 15700 incubado con anterioridad y 300 ml del cultivo mixto incubado de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, la mezcla resultante se utilizó para llenar un recipiente de múltiples capas (volumen: 500 ml) intercalada por el aluminio. El recipiente se selló y se incubó a 37 ºC hasta que el pH llegó a 4,6, y después se enfrió inmediatamente.

El yogur obtenido de este modo tenía un valor de ácido láctico de 0,81%, y contenía $1{,}1x10^{8}$ CFU/ml de la *B. breve* ATCC 15700.

De acuerdo con lo descrito en la presente memoria, este yogur se puede utilizar, sin más modificación, como un alimento o una bebida contra la obesidad o un alimento o una bebida para la mejora de la tolerancia a la glucosa.

<Ejemplo 4: Yogurt>

Con la excepción del uso de *B. breve* MCC 1274 en lugar de la *B. breve* ATCC 15700, se preparó un yogur de la misma manera que en el Ejemplo 3.

El yogur resultante contenía $8{,}5x10^{7}$ CFU/ml de la *B. breve* MCC 1274.

Este yogur se puede utilizar, sin más modificación, como un alimento o una bebida contra la obesidad o un alimento o una bebida para la mejora de la tolerancia a la glucosa de acuerdo con la presente invención.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención es capaz de proporcionar un agente contra la obesidad y un agente de mejora de la tolerancia a la glucosa que son eficaces para la prevención o el tratamiento de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa y también exhiben una seguridad superior, así como también es capaz de proporcionar alimentos o bebidas que contienen estos agentes. Además, la presente invención también es capaz de proporcionar una *Bifidobacterium breve* que es eficaz para la prevención o el tratamiento de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa o la resistencia a la insulina y también exhibe una seguridad superior, así como también es capaz de proporcionar una composición farmacéutica que contiene esta bacteria.

Número de Acceso

FERM BP-11175

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175).

2. Una composición farmacéutica que comprende la cepa bacteriana de acuerdo con lo definido en la reivindicación 1 y en forma opcional un portador aceptable para uso farmacéutico.

3. Un alimento o una bebida o producto nutricional que comprende la cepa bacteriana de acuerdo con lo definido en la reivindicación 1.

4. Una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175) para su uso en el tratamiento contra la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa.

5. La cepa bacteriana para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la cepa bacteriana es para ser administrada en forma de una composición farmacéutica, un alimento, una bebida o un producto nutricional.

6. El uso de una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175) para la producción de una composición para el tratamiento de la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la composición se selecciona del grupo que consiste en una composición farmacéutica, un alimento, una bebida y un producto nutricional.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana que es *Bifidobacterium breve* MCC 1274 (FERM BP-11175) y en forma opcional un portador aceptable para uso farmacéutico**,** en la que la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento contra la obesidad o la mejora de la tolerancia a la glucosa.

FIG. 1

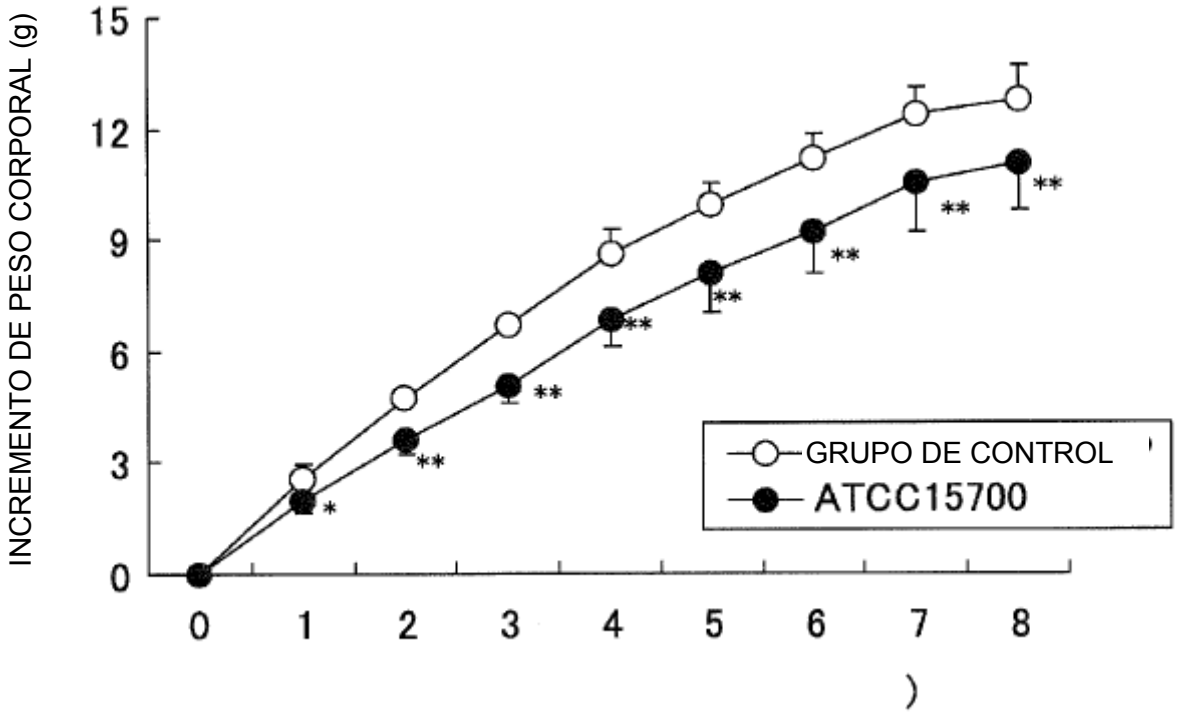

INCREMENTO DE PESO CORPORAL (g)
15
12
9
6
3
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
GRUPO DE CONTROL
ATCC15700
*
**

FIG. 2

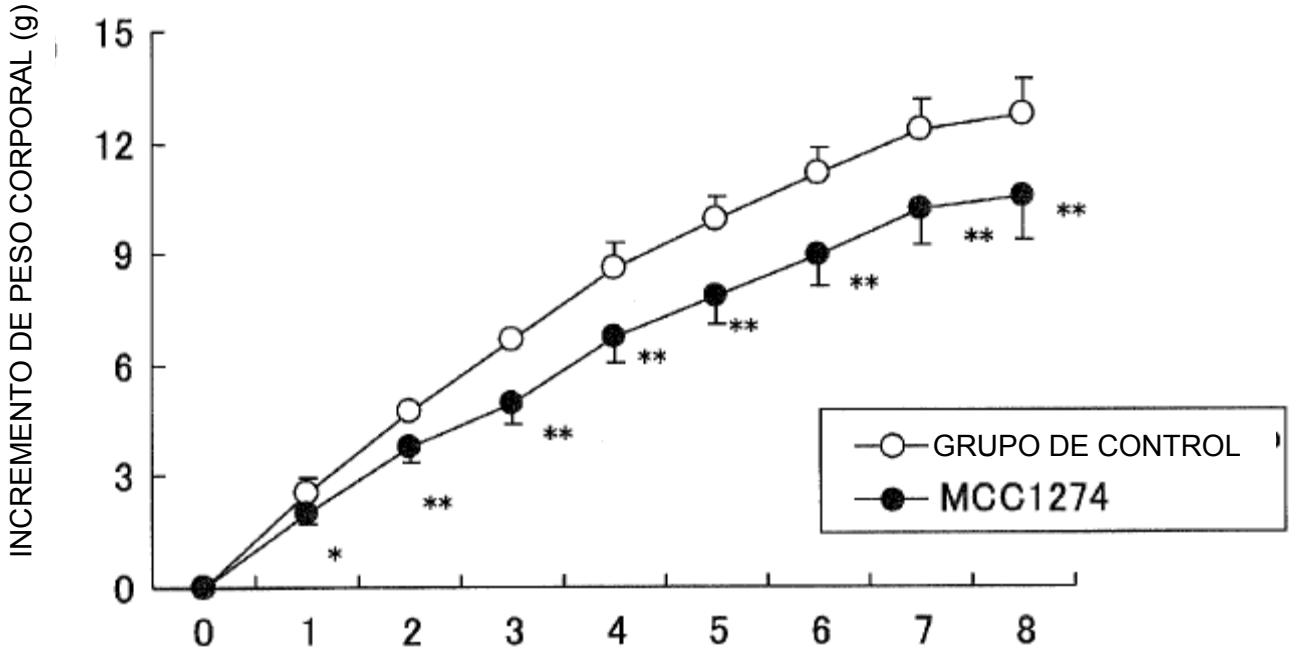

INCREMENTO DE PESO CORPORAL (g)
15
12
9
6
3
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
GRUPO DE CONTROL
MCC1274
*
**

FIG. 3

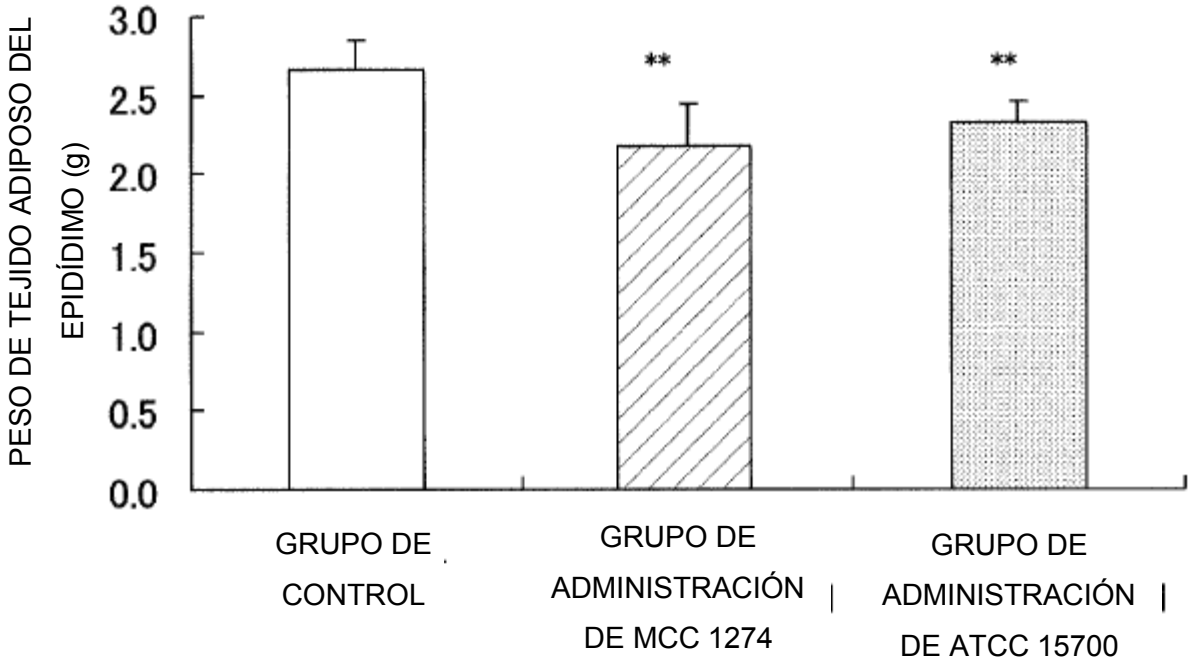
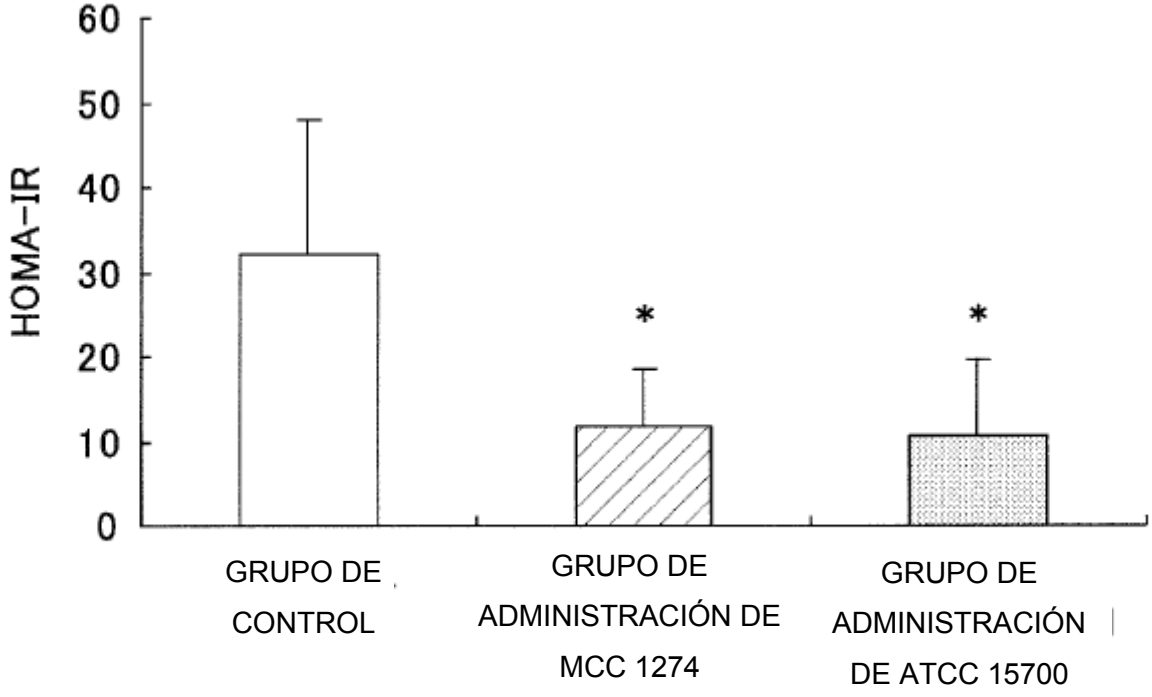

PESO DE TEJIDO ADIPOSO DEL EPIDÍDIMO (g)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
GRUPO DE CONTROL
GRUPO DE ADMINISTRACIÓN DE MCC 1274
GRUPO DE ADMINISTRACIÓN DE ATCC 15700

FIG. 4


HOMA-IR
60
50
40
30
20
10
0
*
*
GRUPO DE CONTROL
GRUPO DE ADMINISTRACIÓN DE MCC 1274
GRUPO DE ADMINISTRACIÓN DE ATCC 15700