(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 671 009**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/40 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
C07K 14/79 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012 PCT/JP2012/071443**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13094250**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12858857 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2796542**

(54) Título: **Promotor de la proliferación de bifidobacterium**

(30) Prioridad:

19.12.2011 JP 2011277081

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

ODA, HIROTSUGU;
YAMAUCHI, KOJI;
SATO, TAKUMI y
SHIMIZU, KANETADA

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 671 009 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

Promotor de la proliferación de bifidobacterium

Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente para promover la proliferación de bifidobacterias, especialmente *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*. El agente promotor de la proliferación de la presente invención se puede utilizar para alimentos, piensos o fármacos.

Antecedentes de la técnica

Se sabe que las bifidobacterias (bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium*) son las más dominantes en la flora bacteriana intestinal de los bebés y se considera que este hecho se relaciona estrechamente con el mantenimiento de la salud de los bebés. El patrón de las especies de bifidobacteria que viven en el intestino humano cambia con la edad. El patrón está constituido principalmente por *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve* en la infancia y está constituido principalmente por *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium adolescentis* en la edad adulta (Documento no de patente 1). Por lo tanto, para mantener la salud de los bebés, es un objeto importante desarrollar alimentos que promuevan la proliferación especialmente de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve* entre las bifidobacterias.

Como una sustancia promotora de la proliferación de bifidobacterium, se conoce lactoferrina entre las proteínas de la leche (Documento no de patente 2) y se utiliza ampliamente lactoferrina bovina para leche en polvo para el cuidado de niños, suplementos, etc.

Además, como péptidos obtenidos mediante digestión enzimática de proteínas de la leche, se conocen glicomacropéptidos de caseína (Documento no de patente 3) y péptidos de lactoferrina humana (Documento no de patente 4). Se ha informado que los péptidos de lactoferrina humana son bifidogénicos (una propiedad de promover la proliferación de bifidobacterias) para *Bifidobacterium bifidum* (Documento de patente 1). Sin embargo, aunque también se detecta *Bifidobacterium bifidum* en la infancia, no es una especie típica.

En cuanto a los péptidos de lactoferrina, se ha informado que algunos péptidos purificados a partir del producto de la digestión con pepsina de lactoferrina bovina tienen actividad antimicrobiana (Documento no de patente 5) y se han sugerido posibilidades de ellos como conservantes de alimentos naturales y agentes antimicrobianos utilizados en los campos de la medicina y medicina veterinaria. Sin embargo, no se conoce que estos péptidos tengan una acción de promoción de la proliferación de bifidobacterium.

Como un agente para promover la proliferación de *Bifidobacterium breve*, se conocen ácido N-acetilneuramínico y/o sialilactosa (Documento de patente 2). Sin embargo, no se conoce ningún péptido que tenga un efecto de promoción de la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*.

Referencias de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: Patente japonesa abierta a inspección pública (KOHYO) N.º 2001-516570
Documento de patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública (KOKAI) N.º 7-267866

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Mitsuoka T., Journal of Intestinal Microbiology (Cyonai Saikingaku Zasshi), 19:179-192, 2005
Documento no de patente 2: Rahman, M.M. et al., Int. J. Food Sci. Tech., 45: 453-458, 2010
Documento no de patente 3: Azuma, N. et al., Agric. Biol. Chem., 48:2159-2162, 1984
Documento no de patente 4: Liepke, C. et al., Eur. J. Biochem., 269:712-718, 2002
Documento no de patente 5: Dionysius, D.A. et al., J. Dairy Sci., 80:667-674, 1997

Sumario de la invención

Objeto a lograr con la invención

Tal como se ha descrito anteriormente, aunque se conocen péptidos procedentes de proteínas de la leche que tienen acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium bifidum*, no se conocen péptidos procedentes de proteínas de la leche que tienen una acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*, que son importantes en la infancia.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente para promover la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*, que comprenda un péptido procedente de una proteína de la leche como un ingrediente activo.

Medios para lograr el objeto

El inventor de la presente invención realizó diversas investigaciones para lograr conseguir el objeto anteriormente mencionado. Como resultado, el inventor de la presente invención encontró que uno de los péptidos informados como péptidos antimicrobianos (J. Dairy Sci., 80:667-674, 1997) y péptidos similares tenían una acción promotora de la proliferación de bifidobacterias, especialmente *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve* y llevó a cabo la presente invención.

La presente invención proporciona así un agente para promover la proliferación de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*, que comprende un dímero peptídico como ingrediente activo, en donde: el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4, en donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido.

La presente invención también proporciona una composición para promover la proliferación de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*, que comprende el agente anteriormente mencionado y una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*.

De acuerdo con una realización preferida de la composición de la presente invención, la composición es un fármaco.

De acuerdo con otra realización preferida de la composición de la presente invención, la composición es un alimento o bebida.

La presente invención además proporciona el uso de un péptido para promover la proliferación de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*, en donde:

el péptido es un dímero peptídico que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4, en donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido.

La presente divulgación también proporciona un método para promover la proliferación de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en Bifidobacterium infantis y Bifidobacterium breve en un animal, que comprende:

administrar un péptido al animal, en donde el péptido es un dímero peptídico que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4, en donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido.

La invención está definida en las reivindicaciones.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación, se explicarán en detalle realizaciones preferidas de la presente invención.

Los porcentajes mencionados en esta memoria descriptiva se utilizan en base a la masa, a menos que se indique específicamente.

El péptido como ingrediente activo del agente promotor de la proliferación de la presente invención es un dímero peptídico que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4, en donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido. Las estructuras del dímero peptídico se muestran mediante las siguientes fórmulas (1) a (3). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos superior e inferior de la fórmula (1) corresponden a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos

superior e inferior de la fórmula (2) corresponden a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos superior e inferior de la fórmula (3) corresponden a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 4, respectivamente. En esta memoria descriptiva, estos dímeros peptídicos también se denominan "péptido activo". El péptido activo puede ser una sal de los dímeros peptídicos anteriormente mencionados.

```
APRKNVRWCTISQPEW
        |                ···(1)
      LECIRA

APRKNVRWCTISQPEW
        |                ···(2)
       ECIRA

APRKNVRWCTISQPEW
        |                ···(3)
       CIRA
```

El péptido activo tiene una acción promotora de la proliferación de bifidobacterium y, especialmente, muestra de forma selectiva una marcada acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*. La "acción promotora de la proliferación" del péptido activo se refiere a una acción para proporcionar un mayor número de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* intestinales cuando el péptido activo es ingerido por un animal o ser humano, en comparación con el observable cuando el péptido activo no es ingerido por el animal o ser humano, o un mayor número de *Bifidobacterium infantis* o *Bifidobacterium breve* cuando la bacteria se cultiva en un medio que contiene el péptido activo, en comparación con el observable cuando la bacteria se cultiva en un medio que no contiene el péptido activo.

El péptido activo muestra una homología de aproximadamente el 50 % con respecto a la estructura del péptido representado por la siguiente fórmula (4), que procede de lactoferrina humana y se sabe que tiene una acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium bifidum* (Liepke, C. et al., Eur. J. Biochem., 2 69:712-718, 2002), pero los espectros de actividad de ellos son completamente diferentes entre sí. Es decir, el péptido activo muestra una acción promotora de la proliferación extremadamente fuerte de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve* en comparación con lactoferrina bovina o el péptido procedente de lactoferrina humana representado por la fórmula (4), mientras que el péptido activo apenas muestra acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium bifidum*, a diferencia de lactoferrina bovina o el péptido procedente de lactoferrina humana de la fórmula (4). La secuencia de aminoácidos del péptido procedente de lactoferrina humana de la fórmula (4) se muestra como la SEQ ID NO: 5.

```
GRRRRSVQWCAVSGPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA ···(4)
```

El péptido activo se puede preparar sintetizando químicamente cada uno de los monómeros peptídicos que constituyen el péptido activo y uniendo esos péptidos con un enlace disulfuro. La síntesis química de los péptidos se puede realizar mediante el método en fase líquida o método en fase sólida utilizados normalmente para la síntesis de oligopéptidos. La desprotección de los péptidos sintetizados se lleva a cabo según se requiera y se eliminan subproductos, reactivos sin reaccionar, etc. Dicha síntesis peptídica se puede realizar mediante el uso de un sintetizador peptídico comercial. Los péptidos diana se aíslan y purifican preferentemente a partir del producto de síntesis (mezcla) anteriormente mencionado. La purificación de péptidos se puede realizar mediante métodos similares a aquellos utilizados normalmente para la purificación de oligopéptidos, por ejemplo, combinaciones apropiadas de diversas técnicas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, cromatografía de fase inversa, cromatografía de partición y cromatografía de filtración en gel, precipitación del disolvente, extracción por saturación de sal, distribución entre dos tipos de fases líquidas, etc. Cuando los péptidos se purifican, se puede determinar si una fracción contiene los péptidos diana mediante la unión de péptidos en la fracción con un enlace disulfuro y la determinación de la acción promotora de la proliferación del dímero obtenido para *Bifidobacterium infantis* o *Bifidobacterium breve* como un índice utilizando el método descrito en los ejemplos y se puede identificar el ingrediente activo en la fracción mediante espectrometría de masas y/o mediante el uso de un secuenciador de proteínas.

Además, los monómeros peptídicos, que constituyen el péptido activo, también se pueden preparar mediante la expresión de ADN recombinantes que codifican los péptidos en una célula hospedadora apropiada. Como el vector requerido para la preparación de los ADN recombinantes y el hospedador, se pueden utilizar aquellos utilizados normalmente para la preparación de proteínas o péptidos.

Con el fin de unir los monómeros peptídicos a través de un enlace disulfuro, por ejemplo, se puede colocar una mezcla de los monómeros peptídicos en una condición de oxidación apropiada. Dicha condición de oxidación apropiada se puede obtener mediante la mezcla de un agente reductor tal como ditiotreitol, glutatión reducido o cistina y un oxidante tal como glutatión oxidado o cisteína en una proporción apropiada. Como los dímeros formados mediante la unión a través de un enlace disulfuro contienen heterodímeros y homodímeros, es preferible aislar y purificar un heterodímero que tenga la estructura de la fórmula (1), (2) o (3). El heterodímero diana se puede aislar y purificar mediante las diversas técnicas de cromatografía descritas anteriormente y similares.

El péptido activo se puede utilizar como agente para promover la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* (a partir de ahora también denominado el "agente de la presente invención") como tal o como una combinación con aditivo(s) farmacéuticamente aceptable(s). Un tipo del péptido activo se puede utilizar independientemente y dos o más tipos de los péptidos activos se pueden utilizar como una mezcla.

La forma de preparación del agente de la presente invención no está particularmente limitada y los ejemplos incluyen comprimidos (incluyendo comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos con recubrimiento entérico y comprimidos bucales), polvos, cápsulas (incluyendo cápsulas entéricas y cápsulas blandas), gránulos (incluyendo gránulos recubiertos), píldoras, trociscos, agentes encapsulados en liposomas, soluciones, preparaciones de liberación sostenida farmacéuticamente aceptables de éstos, etc. Cuando se prepara la preparación, se pueden utilizar aditivos comúnmente utilizados en fármacos orales habituales utilizados como vehículos farmacéuticos, tales como excipientes, aglutinantes, agente disgregantes, lubricantes, estabilizantes, correctivos, diluyentes, tensioactivos y disolventes. Además, siempre que el efecto de la presente invención no se vea afectado, el péptido activo puede utilizarse junto con un agente o composición farmacéutica que tiene una acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*, que ya se conoce o que se encontrará en el futuro. La composición farmacéutica utilizada en conjunto puede estar contenida en el agente de la presente invención como uno de los ingredientes activos o puede no estar contenida en el agente de la presente invención, pero combinada como un fármaco separado con el agente de la presente invención para formar un producto comercial.

Loa ejemplos del vehículo y excipiente utilizado para la preparación anteriormente mencionada incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, almidón de patata, almidón de maíz, carbonato de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, celulosa cristalina, regaliz en polvo, genciana en polvo, etc. y los ejemplos del aglutinante incluyen, por ejemplo, almidón, gelatina, jarabe, alcohol polivinílico, éter polivinílico, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc.

Los ejemplos del agente disgregante incluyen almidón, agar, gelatina en polvo, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa de calcio, celulosa cristalina, carbonato de calcio, hidrogenocarbonato sódico, arginato sódico, etc.

Los ejemplos del lubricante incluyen estearato de magnesio, aceite vegetal hidrogenado, Macrogol, etc. y los ejemplos del colorante incluyen rojo n.º 2, amarillo n.º 4, azul n.º 1, que se permiten agregar a fármacos, etc.

Los comprimidos y granulados se pueden recubrir con sacarosa, hidroxipropilcelulosa, goma laca purificada, gelatina, sorbitol, glicerol, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, metacrilato de metilo, polímero de ácido metacrílico, etc., según sea necesario.

Una realización de la presente invención es el uso del péptido activo en la preparación de un agente para promover la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*. Otra realización de la presente invención es el péptido activo utilizado para promover la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*. Otra realización más de la presente invención es el uso del péptido activo para promover la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*.

Una realización adicional de la presente invención es un método para promover la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* en un animal o ser humano, que comprende la administración del péptido activo al animal o ser humano. Los ejemplos del animal incluyen, bovinos, cabra, oveja, etc. Son especialmente preferidos seres humanos y bovinos.

Aunque el contenido del péptido activo contenido en el agente de la presente invención no está particularmente limitado y puede elegirse apropiadamente, es, por ejemplo, de 0,001 a 10 % en masa, preferentemente de 0,01 a 3 % en masa, en particular preferentemente de 0,1 a 1 % en masa, de la preparación del agente. Cuando el agente de la presente invención contiene dos o más tipos de los péptidos activos, el contenido del péptido es el contenido total de los péptidos.

El agente de la presente invención es útil para la mejora de la flora bacteriana intestinal, control inmunitario, profilaxis o tratamiento de diarrea, estreñimiento, obesidad, enfermedad inflamatoria del intestino, etc.

Aunque el tiempo de administración del agente de la presente invención no está particularmente limitado y se puede elegir apropiadamente de acuerdo con las condiciones del objeto de la administración, puede administrarse a una frecuencia de, por ejemplo, de una vez/3 días a 5 veces/día. La dosis del agente de la presente invención se elige apropiadamente dependiendo de la edad, el sexo, el estado del objeto de administración, otras condiciones, etc. y, por ejemplo, la dosificación de administración se elige preferentemente del intervalo de 10 a 5000 µg/kg/dosis, más preferentemente de 50 a 500 µg/kg/dosis, como un estándar en términos de la cantidad del péptido activo (cuando el péptido activo consiste en dos o más tipos de péptidos, es la cantidad total de los péptidos).

El objeto de la administración es preferentemente un ser humano y los bebés son especialmente preferidos. Además, cuando *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* no es dominante en la flora bacteriana intestinal del objeto de la administración, por ejemplo, cuando el objeto de la administración es una persona diferente a un bebé, es preferible administrar *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* junto con el péptido activo. Tanto el péptido activo como *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* pueden estar contenidos en el agente de la presente invención o pueden combinarse preparaciones separadas que los contienen. Aunque la cantidad de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* con respecto al péptido activo en el agente no está particularmente limitada, es preferentemente de 10 a 10^5 UFC (unidades de formación de colonias)/µg del péptido activo, más preferentemente de 10^2 a 10^4 UFC/µg del péptido activo.

El agente de la presente invención o el péptido activo como el ingrediente activo del agente puede estar contenido en dietas (bebidas y alimentos). El péptido activo o el agente de la presente invención puede estar contenido en un alimento o bebida como un ingrediente activo para preparar un alimento o bebida que tiene una acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*, como una realización del agente para promover la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve*.

Las formas y propiedades de los alimentos y bebidas no están particularmente limitadas, siempre que el efecto del péptido activo no se degrade, y puedan ingerirse por vía oral y puedan prepararse mediante el uso de materias primas utilizadas para bebidas y alimentos habituales y métodos habituales, con la excepción de que se agrega el péptido activo.

Las formas de los alimentos no están particularmente limitadas y pueden estar en forma de líquido, pasta, sólido, polvo o similares. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, comprimidos de confitería y dietas líquidas, así como productos de harina tales como pan, macarrones, espaguetis, fideos, mezcla pastelera, polvo seco y pan rallado; alimentos listos para el consumo tales como fideos instantáneos, fideos en taza, alimentos cocinados y de retorta, comida enlatada, alimentos para calentar en microondas, guisos y sopas instantáneas, sopa miso instantánea y sopa clara japonesa, sopa enlatada, alimentos liofilizados y otros alimentos listos para consumir; productos agrícolas procesados tales como productos agrícolas enlatados, frutas enlatadas, mermeladas y confituras, salmueras, judías cocidas, productos agrícolas secos y cereales (productos de grano procesados); productos marinos procesados tales como productos marinos enlatados, embutidos y jamón de pescado, productos de pasta de mariscos, manjares marinos y tsukudani (productos marinos cocidos en salsa de soja); productos procesados de ganadería tales como pastas y productos de ganadería enlatados y embutidos y jamón de carne de ganadería; leche y productos lácteos tales como leche procesada, bebidas de leche, yogures, bebidas con bacterias de ácido láctico, queso, helados, leche en polvo modificada, cremas y otros productos lácteos; aceites y grasas tales como mantequilla, margarinas y aceites vegetales; condimentos básicos tales como salsa de soja, miso, salsas, condimento de tomate procesado, mirin y vinagres; alimentos y condimentos complejos tales como alimentos precocinados y procesados, curry en polvo o roux, salsas para mojar, aderezos, sopas de fideos, especias y otros condimentos complejos; alimentos congelados tales como materiales alimenticios congelados, alimentos semicocinados congelados y alimentos cocinados congelados; productos de confitería tales como golosinas de caramelo, golosinas, chicles, chocolates, galletas, bollos, pasteles, empanadas, aperitivos, galletas saladas, dulces japoneses, productos de confitería de arroz, productos de confitería de judías, pasteles de postre y otros productos de confitería; bebidas tales como bebidas carbonatadas, zumos de fruta natural, bebidas de zumo de frutas, refrescos de zumo de frutas, bebidas de pulpa de frutas, bebidas de frutas con pulpa de frutas, bebidas a base de vegetales, leche de soja, bebidas de leche de soja, bebidas de café, bebidas de té, bebidas en polvo, bebidas concentradas, bebidas deportivas, bebidas energéticas, bebidas alcohólicas y otras bebidas; otros alimentos comerciales tales como alimentos para bebés, condimentos de arroz y condimentos de algas marinas para arroz hervido empapado con té; leche en polvo modificada para bebés; nutriciones entéricas; alimentos funcionales (alimentos para uso específico en salud, alimentos con mensajes de nutrientes funcionales), etc.

Además, mediante la adición del péptido activo o del agente de la presente invención a un pienso como un ingrediente activo, se puede preparar un pienso que tiene una acción promotora de la proliferación de bifidobacterium, como una realización del agente para promover la proliferación de bifidobacterium.

La forma del pienso no está particularmente limitada. Por ejemplo, el pienso se puede preparar mediante la mezcla de cereales tales como maíz, trigo, cebada, centeno y milo; harinas de aceites vegetales tales como harina de aceite

de soja, harina de aceite de colza, harina de aceite de coco y harina de aceite de linaza; salvados tales como salvado de trigo, salvado de arroz y salvado de arroz desgrasado; harinas de producción tales como harina de gluten de maíz y harina de mermelada de maíz; piensos procedentes de pescado o animales tales como harina de pescado, leche desnatada en polvo, suero, sebo y grasa amarilla; levaduras tales como levadura torula y levadura de cerveza; piensos de material mineral tales como fosfato de calcio y carbonato de calcio; aceites y grasas; aminoácidos de sustancias simples; sacáridos, etc. Los ejemplos de la forma del pienso incluyen, por ejemplo, piensos para mascotas, piensos para ganado, piensos para cría de peces, etc.

Aunque la cantidad del péptido activo contenido en el alimento o bebida (incluyendo pienso) de la presente invención no está particularmente limitado y puede elegirse apropiadamente, puede ser, por ejemplo, de 0,00001 a 1 % en masa, preferentemente de 0,0001 a 0,1 % en masa, en particular preferentemente de 0,001 a 0,01 % en masa, en términos de la cantidad del péptido activo (cuando el péptido activo consiste en dos o más tipos de péptidos, es la cantidad total de los péptidos) en el alimento o bebida.

También se prefiere que el alimento o bebida contenga *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* junto con el péptido activo. La cantidad de *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* con respecto al péptido activo puede ser similar al descrito para el agente de la presente invención.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se explicará más específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1

La síntesis química del péptido de la presente invención que tiene la estructura de la fórmula (1) (a partir de ahora también denominado "Péptido activo 1") y el péptido procedente de lactoferrina humana de la fórmula (4) (a partir de ahora también denominado "péptido de lactoferrina humana") se encargó a Toray Research Center Inc. Las purezas de los péptidos sintetizados fueron superiores al 95 %. Como lactoferrina bovina, se utilizó lactoferrina bovina preparada mediante el método descrito en la patente japonesa abierta a inspección pública (KOKAI) N.º 63-152400, ejemplo 8 (la pureza fue superior al 96 %).

Se ajustó una solución acuosa 9,375 μM de cada péptido a pH 6,5 con una solución acuosa de HCl y se sometió a esterilización por filtración usando una membrana de 0,22 μm. Se diluyó cada solución peptídica con agua de dilución para obtener soluciones de muestra 9,375 μM, 3,125 μM, 0,9375 μM y 0,3125 μM. Como el agua de dilución, se utilizó agua purificada ajustada a pH 6,5 con una solución de HCl y se esterilizó a 115 ºC durante 15 minutos.

Se evaluaron las actividades promotoras de la proliferación de *Bifidobacterium* del péptido anteriormente mencionado como sigue.

Las bifidobacterium utilizadas para el experimento eran como sigue. Estas cepas se pueden obtener a partir de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, http://www.atcc.org/).
Bifidobacterium infantis ATCC 15697^{T}
Bifidobacterium breve ATCC 15700^{T}
Bifidobacterium bifidum ATCC 29521^{T}

Se añadió una suspensión celular de cada cepa crioconservada (100 μl) en un medio de leche desnatada al 10 % al medio líquido MRS (3 ml) y se realizó el cultivo a 37 ºC durante 16 horas en condiciones anaeróbicas. Se añadió el medio de cultivo (100 μl) al medio líquido MRS (3 ml). Se preparó el medio líquido MRS mediante la disolución de Difco Lactobacilli MRS Broth (5.5 g, BD, "Difco" es una marca registrada de Difco Laboratories, Incorporated) y monohidrato de monoclorhidrato de L-cisteína (50 mg, Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.) en agua pura para obtener un volumen final de 100 ml, ajustando la solución a pH 6,5 con una solución acuosa de HCl y esterilizando la solución a 115 ºC durante 15 minutos. Además, se preparó un medio concentrado que contenía los componentes en concentraciones dos veces mayores de la misma manera descrita anteriormente, excepto porque Difco Lactobacilli MRS Broth y monohidrato de monoclorhidrato de L-cisteína se utilizaron en cantidades de 11 g y 100 mg, respectivamente.

Se diluyó el medio de cultivo anteriormente mencionado con el medio líquido MRS para obtener una turbidez de 0,8 medida a una longitud de onda de 630 nm. Además, este medio de cultivo diluido se diluyó 100 veces con el medio líquido MRS. El medio de cultivo diluido obtenido se denomina medio de cultivo diluido al 1 %.

Se realizó un cultivo anaeróbico a 37 ºC durante 16 horas en una mezcla de 100 μl del medio de cultivo concentrado dos veces, 80 μl de una solución de muestra o el agua de dilución y 20 μl del medio de cultivo diluido al 1 % (el volumen de inoculación fue 0,1 %) o el medio líquido MRS (el volumen de inoculación fue 0 %) en una placa de 96 pocillos (FALCON 353072). La concentración final del péptido en la mezcla fue 3,75 μM, 1,25 μM, 0,375 μM, 0,125

μM, o 0 μM.

Después del cultivo, se midió la turbidez de cada medio de cultivo a una longitud de onda de 630 nm y se calculó la relación promotora de la proliferación (%) de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Relación promotora de la proliferación (\%)} = (DO_{s1} - DO_{s0}) / (DO_{c1} - DO_{c0}) \times 100 - 100$$

DO_{s1}: Turbidez observada después del cultivo realizado a una concentración de muestra de 3,75 a 0,125 μM y volumen de inoculación de 0,1 % durante 16 horas
DO_{s0}: Turbidez observada después del cultivo realizado a una concentración de muestra de 3,75 a 0,125 μM y volumen de inoculación de 0% durante 16 horas
DO_{c1}: Turbidez observada después del cultivo realizado a una concentración de muestra de 0 μM y volumen de inoculación de 0,1 % durante 16 horas
DO_{c0}: Turbidez observada después del cultivo realizado a una concentración de muestra de 0 μM y volumen de inoculación de 0% durante 16 horas

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Relación promotora de la proliferación (%)											
	Péptido activo 1 (μM)				Lactoferrina bovina (μM)				Péptido de lactoferrina humana (μM)			
	0,125	0,375	1,25	3,75	0,125	0,375	1,25	3,75	0,125	0,375	1,25	3,75
B. infantis ATCC 15697	15	21	36	206	1	1	13	23	0	2	10	39
B. breve ATCC 15700	28	80	116	512	2	4	8	21	0	1	12	30
B. bifidum ATCC 29521	0	-2	0	-1	8	8	10	12	3	6	9	14

El péptido activo 1 de la presente invención mostró un efecto promotor de la proliferación marcadamente mayor para *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve* en comparación con la lactoferrina bovina y el péptido de lactoferrina humana.

Sin embargo, El péptido activo 1 no mostró efecto promotor de la proliferación de *Bifidobacterium bifidum*.

La lactoferrina bovina tiene un peso molecular de aproximadamente 80.000 y el péptido de lactoferrina humana tiene un peso molecular de 5757,7, pero el péptido activo 1 tiene un peso molecular de 2673,1 (aproximadamente 1/30 y aproximadamente 1/2 de los péptidos anteriores, respectivamente). Por lo tanto, se espera que el péptido activo 1 muestre un efecto elevado con una cantidad menor.

Ejemplo 2

Las síntesis químicas de los péptidos de la presente invención que tienen las estructuras de la fórmula (2) (a partir de ahora también denominado "Péptido activo 2") y la fórmula (3) (a partir de ahora también denominado "Péptido activo 3") se encargaron a Toray Research Center Inc.

Se evaluaron actividades promotoras de la proliferación de *Bifidobacterium* de los péptidos anteriormente mencionados de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

	Relación promotora de la proliferación (%)							
	Péptido activo 2 (μM)				Péptido activo 3 (μM)			
	0,125	0,375	1,25	3,75	0,125	0,375	1,25	3,75
B. infantis ATCC 15697	0	12	48	174	9	18	73	238
B. breve ATCC 15700	5	31	87	139	7	37	85	127
B. bifidum ATCC 29521	-4	-2	0	-1	-1	-2	-3	-4

Los péptidos activos 2 y 3 de la presente invención mostraron un marcado efecto promotor de la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*.

Aplicabilidad industrial

Puesto que el agente promotor de la proliferación de la presente invención tiene una acción promotora de la proliferación de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*, la ingestión del agente puede proporcionar un medio intestinal en el que estas bacterias son dominantes. El péptido como el ingrediente activo del agente promotor de la proliferación de la presente invención procede de una proteína de la leche y, por lo tanto, se espera que sea seguro.

Además, incluso en el caso de un individuo que no sea un bebé, se puede ingerir una composición que contenga el agente promotor de la proliferación de la presente invención y *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium breve* en un estado en que las funciones de las bacterias se mejoran y, por lo tanto, es útil como un fármaco, alimento, bebida o similares.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Morinaga Milk Industry Co., Ltd.

<120> Agente para promover la proliferación de bifidobacterias

<130> X1417 EP S3

<140> EP 12 85 8857,1
<141> 24/08/2012

<150> JP2011-277081
<151> 19/12/2011

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido parcial de lactoferrina bovina

<400> 1

Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp
1 5 10 15

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido parcial de lactoferrina bovina

<400> 2

Leu Glu Cys Ile Arg Ala
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido parcial de lactoferrina bovina

<400> 3

Glu Cys Ile Arg Ala
1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido parcial de lactoferrina bovina

<400> 4

Cys Ile Arg Ala
1

<210> 5
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido parcial de lactoferrina humana

<400> 5

```
Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu
1               5                   10                  15
Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly
            20                  25                  30
Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln
        35                  40                  45
Ala
```

REIVINDICACIONES

1. Un dímero peptídico para su uso en profilaxis o tratamiento de diarrea, estreñimiento, obesidad o enfermedad inflamatoria del intestino, en donde:

el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4, en donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido.

2. El dímero peptídico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

3. El dímero peptídico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

4. El dímero peptídico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

5. El dímero peptídico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho dímero peptídico es para promover la proliferación de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*.

6. Una composición para promover la proliferación de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve,* que comprende un dímero peptídico y una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium breve*,
en donde el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4, en donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la composición es un fármaco.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la composición es un alimento o bebida.

9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicha composición es para su uso en profilaxis o tratamiento de diarrea, estreñimiento, obesidad o enfermedad inflamatoria del intestino.

10. Uso no terapéutico de un dímero peptídico para promover la proliferación de una o más bacterias seleccionadas del grupo que consiste en Bifidobacterium infantis y Bifidobacterium breve, en donde:

el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y un péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4, en donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 a 4 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido.

11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o el uso de la reivindicación 10, en donde el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o el uso de la reivindicación 10, en donde el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o el uso de la reivindicación 10, en donde el dímero peptídico comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

14. Un dímero peptídico que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en donde el péptido que consiste en la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 están unidos a través de un enlace disulfuro entre un resto de cisteína de cada péptido.