

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 684**

51 Int. Cl.:

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 36/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11177784 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2559433**

54 Título: **Método para fabricar un compuesto que disminuya los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2015

73 Titular/es:

**SUNWAY BIOTECH CO., LTD. (100.0%)
N° 139, Xing-ai Rd., Neihu District
Taipei City 11494, TW**

72 Inventor/es:

**PAN, TZU-MING;
LEE, CHUN-LIN y
WU, CHENG-LUN**

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

ES 2 529 684 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

Método para fabricar un compuesto que disminuya los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

1. **Ámbito de la Invención**

10 La presente invención relaciona métodos para elaborar un compuesto que disminuye los lípidos en sangre y eleva las lipoproteínas de alta densidad, y más particularmente la fabricación de un compuesto que contiene monascina o ankaflavina, o una combinación de los mismos, para reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad.

2. **Descripción de los antecedentes**

15 El contenido del colesterol en sangre está directamente vinculado a la incidencia de las enfermedades cardiovasculares. De acuerdo con estudios previos, la dislipidemia juega un importante papel en las enfermedades cardiovasculares, por lo que la concentración del colesterol en sangre puede ser un buen indicador de las mismas. Cuando la concentración del colesterol sérico es más de 200mg/dL, la probabilidad de defunción por enfermedad coronaria se incrementa rápidamente. Una persona con alto contenido de colesterol debería tener un alto índice de morbilidad por enfermedad coronaria y un alto índice de mortalidad, pero si el contenido de colesterol se reduce debido a un tratamiento médico o por un proceso no médico, el índice de incidencia de las enfermedades cardiovasculares causadas por esclerosis coronaria puede reducirse significativamente.

20 En los últimos años, se están desarrollando todo tipo de productos alimenticios saludables, y gradualmente se está prestando más atención a los productos fermentados con *Monascus*. En Asia, la aplicación de diferentes especies de *Monascus* en alimentos y medicina tiene miles de años de historia.

25 Los importantes metabolitos secundarios de la especie *Monascus* incluyen: (1) un grupo de pigmentos, incluyendo pigmentos rojos (rubropunctamina y monascorubramina), pigmentos amarillos (ankaflavina y monascina) y pigmentos naranjas (rubropunctanina y monascorubrina); (2) Sustancias reductoras del colesterol, como la monacolina K (también llamada lovastatina, mevinolina y Mevacor); (3) sustancias reductoras de la presión sanguínea, como el ácido γ -aminobutírico (GABA); y (4) antioxidantes, incluyendo los ácidos dimerumico y 3-hidroxi-4-metoxi-benzoico.

30 De los metabolitos secundarios de las especies *Monascus* mencionados más arriba, la monacolina K puede reducir la actividad de la hidroxil metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), que es una enzima clave en el proceso de biosíntesis del colesterol, por lo que la monacolina K tiene un efecto significativo en la reducción del colesterol.

35 Por otra parte, el colesterol en sangre puede dividirse en dos categorías de acuerdo a su densidad: la Lipoproteína de Alta Densidad – Colesterol (HDL-C) y la Lipoproteína de Baja Densidad – Colesterol (LDL-C). Muchas investigaciones indican que el HDL-C es una especie de colesterol bueno, y LDL-C es un colesterol malo. Una alta concentración de HDL-C y una baja concentración de LDL-C también ayudan a reducir la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y la arteriosclerosis.

40 Dado que el colesterol total (TC) incluye el HDL-C, LDL-C, triglicéridos (TG) y otros colesteroles de lipoproteínas, puede ser que el incremento de HDL-C y LDL-C venga acompañado de un incremento del TC y viceversa. Muchas investigaciones apuntan que al reducir el nivel de TC con medicamentos reductores del colesterol, también se reduce en gran medida la concentración del HDL-C. Sin embargo, si se mantiene o eleva la concentración de HDL-C, se consigue prevenir enfermedades cardiovasculares.

45 Sin embargo, aunque la ya mencionada monacolina K tiene el efecto de reducir el colesterol, no eleva la concentración de HDL-C, y por tanto, el efecto de prevenir enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis empleando monacolina K es muy limitado.

En vista de esto, es necesario proporcionar un compuesto novedoso y los medios para fabricarlo, cuya formulación tenga el efecto de reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de HDL-C simultáneamente, para reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis de forma efectiva.

50 Los siguientes documentos describen métodos utilizados con anterioridad para elaborar compuestos de ankaflavina/monascina:

DATABASE WPI, Week 201113 Thomson Scientific, Londres, GB; AN 2010-P32505, & CN 101 864 191 A (UNIV FUZHOU) 20 de octubre de 2010.

5 FIELDING B C ET AL: " THE CHEMISTRY OF FUNGI. PART XXXIX. THE STRUCTURE OF MONASCIN", JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL SOCIETY, LETCHWORTH; GB, 1 de enero de 1961, pág. 4579-4589.

DATABASE WPI, Week 199727 Thomson Scientific, Londres, GB;

AN 1997-290194 XP002667421, & CN 1 103 891 A (JIANGMEN BIOTECHNOLOGY DEV CENT GUANGDON) 21 JUNE 1995.

10

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 En vista de las deficiencias mencionadas anteriormente, los investigadores recurrieron a su experiencia, imaginación y creatividad, realizaron experimentos e investigaciones repetidamente, y finalmente idearon el presente hallazgo, un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad, y un método para fabricarlo.

El mayor objetivo era encontrar el método para fabricar el compuesto que redujera los lípidos en sangre y elevara las lipoproteínas de alta densidad de acuerdo con el punto 1, que incluye monascina y puede conseguir los efectos deseados de forma efectiva.

20 De acuerdo con dicho objetivo, basamos la composición en la monascina, que es un pigmento amarillo del *Monascus* y se extrae del producto fermentado con dicho moho. Del proceso de extracción se obtiene un compuesto que contiene monascina que puede reducir la concentración de los lípidos en sangre a la vez que eleva la concentración de las lipoproteínas de alta densidad de forma efectiva.

25 Dicho proceso de extracción comprende los siguientes pasos: (1) obtener un producto fermentado con *Monascus*; (2) tratar el producto fermentado con *Monascus* con acetona tres veces; (3) elevar la concentración del producto obtenido en el paso previo por descompresión en un rango específico de temperatura; (4) separar la fracción de pigmentos por cromatografía en columna de gel de sílice; (5) separar la fracción del pigmento amarillo de la fracción de pigmentos por cromatografía en columna Sephadex LH-20; (6) separar la fracción conteniendo monascina y ankaflavina de la fracción del pigmento amarillo por cromatografía en columna de gel de sílice; y (7) separar la monascina de la fracción que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso previo por un preparado por cromatografía líquida de alta eficacia (pre-HPLC).

30 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de fabricación de un compuesto que disminuya los lípidos en sangre y eleve las lipoproteínas de alta densidad de acuerdo con la reivindicación 3, compuesto que incluiría ankaflavina, un pigmento amarillo del *Monascus* que es extraído de productos fermentados con dicho moho.

35 De acuerdo con dicho objetivo, proporcionamos un método para, a través de una serie de procesos de extracción, obtener un compuesto que contenga ankaflavina, que puede reducir la concentración de lípidos y elevar la concentración de lipoproteínas de alta densidad en sangre de forma efectiva.

40 Dicho proceso de extracción comprende los siguientes pasos: (1) obtener un producto fermentado con *Monascus*; (2) tratar el producto fermentado con *Monascus* con acetona tres veces; (3) elevar la concentración del producto obtenido en el paso anterior por descompresión en un rango específico de temperatura; (4) separar la fracción de pigmentos por cromatografía en columna de gel de sílice; (5) separar la fracción del pigmento amarillo de la fracción de pigmentos por cromatografía en columna Sephadex LH-20; (6) separar la fracción que contiene monascina y ankaflavina de la fracción del pigmento amarillo por cromatografía en columna de gel de sílice; y (7) separar la ankaflavina de la fracción que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso previo por pre-HPLC.

45 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de fabricación de un compuesto que disminuya los lípidos en sangre y eleve las lipoproteínas de alta densidad de acuerdo con el punto 5, compuesto que incluiría monascina y ankaflavina, ambos pigmentos amarillos extraídos de productos fermentados con *Monascus*.

50 De acuerdo con dicho objetivo, proporcionamos un método para, a través de una serie de procesos de extracción, obtener un compuesto que contenga monascina y ankaflavina, cuya composición puede reducir la concentración de lípidos y elevar la concentración de lipoproteínas de alta densidad en sangre de forma efectiva.

El proceso de extracción de tal compuesto comprende los siguientes pasos: (1) obtener un producto fermentado con *Monascus*; (2) tratar el producto fermentado con *Monascus* con acetona tres veces; (3) elevar la concentración del producto obtenido en el paso anterior por descompresión en un rango específico de temperatura; (4) separar la fracción de pigmentos por cromatografía en columna de gel de sílice; (5) separar la fracción del pigmento amarillo de la fracción de pigmentos por cromatografía en columna Sephadex LH-20; (6) separar la fracción conteniendo monascina y ankaflavina de la fracción del pigmento amarillo por cromatografía en columna de gel de sílice; (7) separar la ankaflavina de la fracción que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso previo por pre-HPLC; y (8) mezclar la monascina y ankaflavina de acuerdo con una proporción específica.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para una completa comprensión de los aspectos, estructuras y técnicas del producto de nuestra investigación, hay que hacer referencia a la descripción detallada y las figuras que la acompañan, a saber:

FIG. 1 es un diagrama de flujo del método para fabricar un producto fermentado con *Monascus*;

15 FIG. 2 es un diagrama de flujo del método para fabricar un compuesto que reduzca los lípidos en sangre y eleve las lipoproteínas de alta densidad de acuerdo a la primera forma de obtención según la investigación realizada;

FIG. 3 es un diagrama de flujo detallando el paso 104 de acuerdo a la primera forma de obtención según la investigación realizada;

20 FIG. 4 es un diagrama de flujo detallando el paso 105 de acuerdo a la primera forma de obtención según la investigación realizada;

FIG. 5 es un diagrama de flujo detallando el paso 106 de acuerdo a la primera forma de obtención según la investigación realizada;

FIG. 6 es un diagrama de flujo detallando el paso 107 de acuerdo a la primera forma de obtención según la investigación realizada;

25 FIG. 7 es un diagrama de flujo del método para fabricar un compuesto que reduzca los lípidos en sangre y eleve las lipoproteínas de alta densidad de acuerdo a la segunda forma de obtención según la investigación realizada;

FIG. 8 es un diagrama de flujo detallando el paso 207 de acuerdo a la segunda forma de obtención según la investigación realizada;

30 FIG. 9 es un diagrama de flujo del método para fabricar un compuesto que reduzca los lípidos en sangre y eleve las lipoproteínas de alta densidad de acuerdo a la tercera forma de obtención según la investigación realizada;

FIG. 10 es un diagrama de flujo detallando el paso 307 de acuerdo a la tercera forma de obtención según la investigación realizada;

FIG. 11 es un diagrama de resultados cuantitativos de un experimento de tinción en placa con lípidos; y

35 FIG. 12 es un diagrama comparativo de la inhibición del colesterol con monascina, ankaflavina y monacolina K en la misma concentración.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS MODOS DE REALIZACIÓN PREFERIDOS

40 Para alcanzar los anteriores objetivos, los investigadores utilizan un producto fermentado con *Monascus* como sustrato de extracción, y extraen el producto fermentado con *Monascus* por medio de una serie de procesos específicos, bajo constantes pruebas y regulaciones, consiguiendo así un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad y un método para elaborar el resultado de la presente investigación.

45 A partir de este punto se describen el compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad y el método para manufacturar el resultado de la presente investigación.

Antes de presentar las modalidades preferidas según la presente investigación, debemos ilustrar el método de obtención del producto fermentado con *Monascus*.

Este método de obtención se explica en el diagrama de flujo de la FIG.1. Este método consta de los siguientes pasos: (001) proporcionar un sustrato, que puede ser arroz o dioscorea, con un contenido de agua inferior al 15%, siendo el contenido óptimo un 7%; (002) añadir agua al sustrato para conseguir una proporción de sustrato a agua de 1:0.5% ~ 1:1.5%, siendo la óptima 1:0.75%; (003) empapar el sustrato en agua durante 0~60 minutos, siendo el tiempo óptimo 30 minutos; (004) esterilizar el sustrato a 121°C durante 10~60 minutos; (005) enfriar el sustrato para formar un medio de cultivo; (006) inocular un *Monascus spp.* Específico como por ejemplo el *Monascus purpureus* al medio de cultivo; (007) cultivar el medio inoculado con el *Monascus spp.* a una temperatura de 25~37°C, una humedad del 50~80% y durante 8~20 días, siendo las condiciones óptimas 30°C y 60% de humedad durante 10 días; (008) secar el producto fermentado de *Monascus* cultivado en el paso previo para que su contenido de agua sea inferior al 15%, siendo el idóneo el 6%. Siguiendo estos pasos, se obtiene el producto fermentado con *Monascus*.

En el método descrito para fabricar el producto fermentado, las cepas de *Monascus* utilizadas pueden ser la *Monascus purpureus* NTU 568 o bien la *Monascus purpureus* PAN 790.

La *Monascus purpureus* NTU 568 se depositó en la Agricultural Research Culture Collection (NRRL) el 13 de noviembre de 2009, y su número asignado es el NRRL 50338. Las características del *Monascus purpureus* NTU 568 incluyen crecimiento rápido, una fuerte capacidad de hidrólisis del almidón, y una gran capacidad de producción de metabolitos. La forma básica de cultivar el *Monascus purpureus* NTU 568 es en un medio con un 2% de polvo de arroz, las mejores condiciones son una temperatura de 30°C y 1 atm de presión durante 48 horas, y el crecimiento requiere de la presencia de oxígeno.

La *Monascus purpureus* PAN 790 se depositó en la Agricultural Research Culture Collection (NRRL) el 13 de noviembre de 2009, y su número asignado es el NRRL 50337. Las características del *Monascus purpureus* PAN 790 incluyen crecimiento lento, gran capacidad de producción de monacolina K, y ser mutado y clonado del moho del arroz rojo. El medio de cultivo del *Monascus purpureus* PAN 790 contiene un 2% de polvo de arroz, y las condiciones son 30°C de temperatura y 1 atm de presión durante 48 horas; para esterilizar el *Monascus purpureus* PAN 790, se calienta a 121 °C durante 20 min; el pH antes de esterilizar es de 5; el crecimiento del *Monascus purpureus* PAN 790 depende del oxígeno, y su temperatura de almacenaje es de 4°C.

Procedemos a detallar la primera modalidad preferida de elaboración del compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad. Ésta contiene monascina, que es un pigmento amarillo de *Monascus*, y extraído del producto fermentado ya mencionado. Para conseguir el efecto deseado en un adulto, éste deberá tomar una cantidad de monascina superior a 2,4 mg por día.

El proceso que describimos a continuación se describe en el diagrama de flujo de la FIG.2, que detalla el proceso de elaboración del compuesto en su primera modalidad. Los pasos son los siguientes: (101) obtener el producto fermentado con *Monascus*; (102) tratar el producto fermentado con *Monascus* tres veces con acetona, siendo la relación producto-acetona de 1:10~1:50; (103) elevar la concentración del producto obtenido en el paso previo por descompresión en el rango de temperaturas específico de 40°C~60°C; (104) separar la fracción de pigmento del producto obtenido en la fase anterior utilizando cromatografía en columna de gel de sílice; (105) separar la fracción de pigmento amarillo por medio de cromatografía en columna Sephadex LH-20; (106) separar la fracción que contiene monascina y ankaflavina de la fracción de pigmento amarillo por cromatografía en columna de gel de sílice; y (107) separar la monascina de la fracción que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso previo por preparado de cromatografía líquida de alta eficacia (pre-HPLC).

La FIG.3 es un diagrama de flujo que detalla el paso 104 de acuerdo con la primera modalidad de elaboración del compuesto. El paso 104 puede dividirse en los siguientes pasos: (104a) añadir el producto obtenido en el paso 103 a una columna de gel de sílice; (104b) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo a la siguiente lista: hexano, hexano:etanol = 9:1, hexano:etanol = 8:2, hexano:etanol 7:3, hexano:etanol 1:1 y etanol; (104c) recoger 12~15 fracciones que fluyen desde la columna de gel de sílice, siendo el tiempo de flujo para cada fracción de 5 a 10 minutos; (104d) analizar las fracciones recogidas en el paso previo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en combinación con una matriz de fotodiodos (PDA), y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y (104e) mezclar las fracciones obtenidas en el paso previo para formar la fracción de pigmento.

La FIG.4 es un diagrama de flujo que detalla el paso 105 de acuerdo con la primera modalidad de elaboración del compuesto. El paso 105 puede dividirse en los siguientes pasos: (105a) añadir la fracción de pigmento obtenida en el paso 104 a una columna Sephadex LH-20; (105b) añadir una solución de lavado metanol:acetonitrilo = 9:1 a la columna Sephadex LH-20; (105c) recoger de 3 a 5 fracciones de las que fluyen desde la columna Sephadex LH-20, siendo el tiempo de flujo de cada fracción de 5 a 10 minutos; (105d) analizar las fracciones recogidas en el paso previo con HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y (105e) mezclar las fracciones recogidas en el paso previo para formar la fracción de pigmento amarillo.

La FIG.5 es un diagrama de flujo que detalla el paso 106 de acuerdo a la primera modalidad de elaboración del compuesto. El paso 106 puede dividirse como sigue: (106a) añadir la fracción de pigmento amarillo obtenida en el paso 105 a una columna de gel de sílice; (106b) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo a la siguiente lista: diclorometano:etanol = 95:5, diclorometano:etanol = 9:1, y diclorometano: etanol = 4:1; (106c) recoger de 3 a 5 fracciones de las que fluyen desde la columna de gel de sílice, siendo el tiempo de flujo para cada fracción de 5 a 10 minutos; (106d) analizar las fracciones obtenidas en el paso previo con HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y (106e) mezclar las fracciones obtenidas en el paso anterior para formar la fracción que contenga monascina y ankaflavina.

La FIG.6 es un diagrama de flujo que repasa en detalle el paso 107 de acuerdo a la primera modalidad de elaboración del compuesto. El paso 107 puede dividirse como sigue: (107a) lavar y separar la fracción que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso 106 por medio de una columna C_{18} en combinación con HPLC y una solución de lavado metanol:agua = 85:15; (107b) recoger 2 fracciones resultantes de la Columna C_{18} , el tiempo estimado de salida de la columna de gel de sílice para cada una de ellas es de 5 a 10 minutos; y (107c) analizar las fracciones recogidas en el paso anterior con HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina.

En los anteriores pasos 104d, 105d y 106d, la columna aplicada en el proceso HPLC es una columna C_{18} (25 cm * 4.6 mm, i.d. = 5 μ m), la fase móvil es acetonitrilo:agua:trifluoroacetato = 62:38:0.05, la velocidad del flujo es 1mL/min, y la absorción de UV de menos de 231nm se percibe con un detector de múltiples longitudes de onda (ya que las curvas de monascina y ankaflavina tienen picos en longitudes de onda inferiores a 231 nm). Además, es necesario contrastar los resultados con muestras de referencia de monascina y ankaflavina, para determinar con certeza si las sustancias analizadas son monascina y ankaflavina o no.

En el ya mencionado paso 107c, las condiciones de análisis del proceso HPLC son prácticamente las mismas que en los pasos 104d, 105d y 106d. Sin embargo, el aspecto especial del 107c es que la monascina y ankaflavina se separan una de otra gracias a su diferencia de polaridad. Debido a que la columna C_{18} separa los componentes más polares primero, y la monascina es más polar en relación a la ankaflavina, la monascina puede ser extraída de la columna C_{18} antes que la ankaflavina. Debido a esta propiedad, la monascina es extraída antes, pudiendo identificar sus fracciones comparando el tiempo de extracción y la absorción de longitudes de onda con la monascina de referencia.

A continuación procedemos a detallar la segunda modalidad preferida de elaboración del compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad. Esta modalidad contiene ankaflavina, un pigmento amarillo de *Monascus*, y extraído del ya mencionado producto fermentado con *Monascus*. Para conseguir el efecto deseado de reducción de lípidos en sangre y aumento de las lipoproteínas de alta densidad de forma efectiva en un adulto, éste deberá tomar una cantidad de ankaflavina superior a 0,6 mg por día.

La FIG.7 es un diagrama de flujo del método para elaborar el compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar el nivel de lipoproteínas de alta densidad de acuerdo con la segunda modalidad preferida de elaboración. Los pasos 201~206 no se volverán a describir aquí. La diferencia entre los métodos primero y segundo es que el paso 207 de la segunda modalidad separa la ankaflavina con un proceso pre-HPLC.

La FIG.8 es un diagrama de flujo detallado del paso 207 de acuerdo a la segunda modalidad de elaboración. El paso 207 puede subdividirse en los siguientes pasos: (207a) lavado y separado de la fracción que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso 206 por una columna C_{18} en combinación con HPLC y una solución de lavado, que en el paso (7.1) es metanol:agua = 85:15; (207b) recoger 2 fracciones de las que fluyen desde la columna C_{18} , siendo el tiempo de flujo para cada fracción de 5 a 10 minutos; y (207c) analizar las fracciones obtenidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan ankaflavina.

En el ya mencionado paso 207c, la monascina y ankaflavina se separan una de otra gracias a su diferencia de polaridad. Debido a que la columna C_{18} separa los componentes más polares primero, y la monascina es más polar en relación a la ankaflavina, la monascina puede ser extraída de la columna C_{18} antes que la ankaflavina. Debido a esta propiedad, la ankaflavina puede ser extraída en fases más avanzadas del proceso, pudiendo identificar sus fracciones comparando el tiempo de extracción y la absorción de longitudes de onda con la ankaflavina de referencia.

A continuación procedemos a detallar la tercera modalidad preferida de elaboración del compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad. Esta modalidad contiene monascina y ankaflavina, ambos pigmentos amarillos de *Monascus*, y extraídos del ya mencionado producto fermentado con *Monascus*. La relación del contenido de monascina y ankaflavina está en el rango desde 1:1 a 10:1, siendo la relación óptima entre monascina y ankaflavina la de 3.56:1. Para conseguir el efecto deseado de reducción de lípidos en sangre y aumento de las lipoproteínas de alta densidad de forma efectiva en un adulto, éste deberá tomar una cantidad de monascina superior a los 2,4 mg por día, y una de ankaflavina superior a 0,6 mg por día.

La FIG.9 es un diagrama de flujo del método para elaborar el compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar el nivel de lipoproteínas de alta densidad de acuerdo con la tercera modalidad preferida de elaboración. Los pasos 301~306 de esta modalidad son casi idénticos a los pasos 101~106 y 201~206, por lo que no se volverán a describir aquí. La diferencia entre el tercer método en relación al primero y segundo métodos es que el paso 307 de la tercera modalidad separa la monascina y ankaflavina con un proceso pre-HPLC. Además, de acuerdo con el paso 308, hay que mezclar la monascina y ankaflavina de acuerdo a una proporción específica en el rango de 1:1 a 10:1, siendo la relación óptima entre monascina y ankaflavina la de 3.56:1.

La FIG.10 es un diagrama de flujo detallado del paso 307 de acuerdo a la tercera modalidad de elaboración. El paso 307 puede subdividirse en los siguientes pasos: (307a) lavado y separado de la fracción que contiene monascina y ankaflavina obtenido en el paso 306 por una columna C₁₈ en combinación con HPLC y una solución de lavado metanol:agua = 85:15; (307b) recoger 2 fracciones de las que fluyen desde la columna C₁₈, siendo el tiempo de flujo para cada fracción de 5 a 10 minutos; y (307c) analizar las fracciones obtenidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina respectivamente.

En el ya mencionado paso 307c, la monascina y ankaflavina se separan una de otra gracias a su diferencia de polaridad. Debido a que la columna C₁₈ separa los componentes más polares primero, y la monascina es más polar en relación a la ankaflavina, la monascina puede ser extraída de la columna C₁₈ antes que la ankaflavina.

Debido a esta propiedad, la monascina puede recogerse en las fases iniciales del proceso, y la ankaflavina puede ser extraída en fases más avanzadas, pudiendo identificar sus fracciones comparando el tiempo de extracción y la absorción de longitudes de onda con la monascina y la ankaflavina de referencia.

Para demostrar que los compuestos de las modalidades primera, segunda y tercera tienen la propiedad de reducir los lípidos en sangre y aumentar los niveles de lipoproteína de alta densidad, se analizan las composiciones y se comparan sus efectos en varios experimentos tal y como se indica a continuación. A partir de ahora, la composición de la primera modalidad es denominada monascina (abreviado MS), y la cantidad de monascina administrada a un animal experimental equivale a 9,82 mg al día para un adulto humano; la composición de la segunda modalidad se denomina ankaflavina (abreviado AF) y la cantidad de ankaflavina administrada a un animal experimental equivale a 1,43 mg al día para un adulto humano; la composición de la tercera modalidad es denominada monascina + ankaflavina (abreviado MS+AF), y la cantidad de monascina y ankaflavina administradas a un animal experimental equivale a 9,82 mg de monascina y 1,43 mg de ankaflavina al día para un adulto humano. Además, se utiliza como referencia para comparación un compuesto que contiene monacolina K (abreviado MK).

Primeramente, el experimento utiliza hamsters alimentados con una dieta alta en colesterol como animales experimentales, a los que posteriormente se administra MS, AF, MS+AF y MK durante 8 semanas, y en ese momento se analizan todos y cada uno de los parámetros del colesterol en sangre de los hamsters. Dichos parámetros incluyen el colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), la relación entre LDL-C y HDL-C, y malondialdehído (MDA). La cantidad de MK tomada por los animales experimentales equivale a 2,89 mg por día para un humano adulto. El grupo de animales con dieta normal es denominado NOR, y el grupo con dieta alta en colesterol se denomina HC.

A continuación presentamos dos tablas. La primera (tabla 1) muestra los resultados de los experimentos ya mencionados, y la segunda (tabla 2) muestra las variaciones en la concentración de MS, AF, MS+AF y MK del grupo HC. En los resultados en los que se reduce el TC, los grupos con MS y AF bajan significativamente sus niveles de TC en suero, y el efecto de ambos es mejor que el de MK; el grupo de MS+AF tiene un mejor efecto disminuyendo el TC que los otros grupos. Para reducir los TG, los grupos de MS, AF y MS+AF reducen significativamente la concentración de TG en suero, siendo su efecto mejor que el de MK. En lo que respecta al aumento de HDL-C, los grupos de MS y AF incrementan significativamente la concentración en suero, siendo su efecto mejor que el de MK; el grupo de MS+AF tiene el efecto de incrementar la cantidad de HDL-C mejor que los otros grupos. En lo que respecta a la reducción de LDL-C, aunque el grupo de MS tiene casi el mismo efecto que el de MK, los grupos de AF y MS+AF reducen mucho más la concentración de LDL-C que el de MK. En lo que respecta a la relación LDL/HDL, el efecto del grupo MS es mejor que el del MK, y los efectos del AF y MS+AF son mejores que los de otros grupos, por lo que podemos concluir que la monascina, ankaflavina y monascina+ankaflavina contribuyen mejor a la prevención de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis que la monacolina K. En lo que respecta a reducir la concentración de MDA, los grupos de MS, AF y MS+AF son significativamente efectivos, y todos estos grupos son mejores que el MK.

Tabla 1

Grupo	Contenido TC (mg/dL)	ContenidoTG (mg/dL)	ContenidoHD L-C (mg/dL)	ContenidoLD L-C (mg/dL)	LDL/HDL	Contenido MDA (mg/dL)
NOR	111.8 ±10.7	168.8 ±35.6	66.6 ±5.97	19.9 ±2.59	0.278 ±0.038	8.93 ±1.79
HC	236.5 ±18.9	226.3 ±76.5	98.1 ±8.89	68.3 ±9.75	0.569 ±0.093	11.80 ±1.85
MK	190.3 ±25.1	131.1 ±36.7	96.9 ±8.84	45.0 ±6.97	0.489 ±0.050	10.37 ±1.73
MS	165.8 ±10.6	82.8 ±9.0	114.2 ±9.36	45.1 ±3.36	0.416 ±0.022	8.62 ±1.45
AF	168.9 ±11.5	94.5 ±18.0	118.6 ±8.09	39.4 ±5.80	0.355 ±0.049	9.07 ±1.45
MS+AF	160.3 ±7.6	85.6 ±10.60	125.7 ±7.30	38.5 ±3.10	0.351 ±0.051	8.45 ±1.23

Tabla 2

Grupo	Reducción de TC (%)	Reducción de TG (%)	Incremento de HDL-C (%)	Reducción de LDL-C (%)	Reducción de LDL/HDL (%)	Reducción de MDA (%)
MK	19.6	42.1	-1.2	34.1	14.1	16.5
MS	29.9	63.4	14.1	33.9	26.9	40.1
AF	28.6	58.2	17.3	42.3	37.6	59.6
MS+AF	29.2	63.8	22.0	43.6	38.3	58.9

- 5 Otro indicador importante para evaluar la arteriosclerosis es el análisis de tinción de placa de lípidos en arterias, y sus resultados pueden determinar si se depositan placas de lípidos en las paredes vasculares arteriales. Grandes cantidades de lípidos con sobreoxidación pueden depositar células espumosas de forma masiva, lo que hace que las paredes arteriales pierdan elasticidad y se depositen grandes cantidades de placa de lípidos, que acabarían causando arteriosclerosis. La FIG.11 es un diagrama de los resultados cuantitativos del experimento de tinción de placa. Los resultados demuestran que la dieta alta en colesterol (grupo HC) durante ocho semanas puede causar que los animales experimentales depositen grandes cantidades de placa de lípidos en las paredes arteriales de la cavidad torácica, y que la cantidad depositada de placa en el grupo NOR es menor que la del grupo HC. Aunque el grupo MK (tomando el equivalente a 2,89mg por día en un adulto humano) puede reducir la cantidad de placa de lípidos, el efecto del grupo MK no es tan bueno como el de los grupos MS (tomando el equivalente a 9,82mg al día por adulto humano), AF (tomando el equivalente a 1,43mg al día por adulto humano) y MS+AF (con una relación monascina:ankaflavina de 3.56:1). El efecto del grupo AF es mejor que el de MS, y el de MS+AF mejor que el del grupo AF.

- 20 Para poder comparar el efecto inhibitorio de la biosíntesis de colesterol de la monascina, ankaflavina y monacolina K en la presente investigación, se ha aplicado un experimento con células, tratándolas con monascina, ankaflavina y monacolina K en la misma concentración (100ppb) y ver cómo eso afectaba a la biosíntesis del colesterol. La FIG.12 es un diagrama comparativo del efecto de inhibición del colesterol de la monascina, ankaflavina y monacolina K con la misma concentración. Los resultados demuestran que la ankaflavina tiene el mejor efecto inhibitorio de la biosíntesis del colesterol, seguido de la monascina, y la monacolina K tiene el efecto más débil. Estos resultados son consistentes con los experimentos realizados con animales, que indican que la ankaflavina y monascina tienen mejor efecto reductor de los lípidos en sangre que la monacolina K.

- 30 Podemos deducir de los experimentos realizados que la monascina, ankaflavina y monascina+ankaflavina pueden reducir TC, TG, LDL-C, MDA, y placas de lípidos significativamente, y pueden elevar la concentración de HDL-C en suero, además, se comprueba que el efecto de monascina+ankaflavina es superior al de la monascina o la ankaflavina por separado. Así, los compuestos elaborados según la primera, segunda o tercera modalidades pueden, ya no sólo reducir la concentración de lípidos en sangre, sino también de elevar la concentración del HDL-C en suero, para una óptima contribución a reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis.

De la descripción detallada y contenido técnico del presente documento, podemos deducir las siguientes ventajas:

- 35 1. Cada uno de los compuestos mencionados en el presente documento tienen el efecto de reducir los lípidos en sangre y elevar las lipoproteínas de alta densidad, por lo que estos compuestos pueden ser usados en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis.

2. Siguiendo los métodos detallados en el presente documento, pueden obtenerse compuestos de alta pureza que pueden ser aplicados para reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis.
3. Cada uno de los compuestos mencionados en el presente documento se extraen del producto fermentado del *Monascus* y no sintetizados artificialmente, y por tanto los compuestos pueden ser catalogados como suplementos alimenticios naturales que no sólo reducen la incidencia de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis, sino que pueden evitar la aparición de efectos secundarios.

Debe entenderse que las modalidades descritas en el presente documento son meramente ilustrativos de los conceptos técnicos y capacidades de la invención, y que no limitan en forma alguna el alcance de la misma. Aquellos versados en la materia deberían ser capaces de poder reproducir los pasos después de leer el documento. Es posible hacer variaciones o modificaciones sin apartarse del espíritu de la investigación.

Como resultado del proceso, los investigadores han sido capaces de determinar la composición con las ventajas arriba descritas. Esta invención cumple los requerimientos para solicitar una patente sobre la misma, que ya ha sido debidamente solicitada. Se espera que pueda examinarse sin más dilación para poder garantizar los derechos de los investigadores cuanto antes.

REIVINDICACIONES

1. Método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad. Este método consta de los siguientes pasos:
 - (1) Obtener un producto fermentado con *Monascus*;
 - 5 (2) tratar el producto fermentado con *Monascus* tres veces con acetona, estando la relación producto fermentado : acetona en el rango 1:10 ~ 1:50;
 - (3) elevar la concentración del producto obtenido en el paso previo por un proceso de descompresión en un rango de temperatura entre 40°C ~60°C;
 - (4.1) añadir el producto obtenido en el paso (3) a una columna de gel de sílice;
 - 10 (4.2) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo con el paso (4.2), hexano, hexano : etanol = 9:1, hexano : etanol = 8:2, hexano : etanol = 7:3, hexano : etanol = 1:1, y etanol;
 - (4.3) recoger 12~15 fracciones de las que fluyen desde la columna de gel de sílice;
 - 15 (4.4) analizar las fracciones recogidas en el paso previo con cromatografía líquida de alta eficacia junto con una matriz de fotodiodos (HPLC-PDA), y conservar las fracciones que contengan monascina y ankaflavina;
 - (4.5) mezclar las fracciones conseguidas en el paso previo para formar una fracción de pigmento;
 - (5) separar la fracción de pigmento amarillo de la fracción de pigmento con una cromatografía en columna Sephadex LH-20;
 - (6.1) añadir la fracción de pigmento obtenida en el paso (5) a una columna de gel de sílice;
 - 20 (6.2) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo con el paso (6.2), diclorometano : etanol = 95:5, diclorometano : etanol = 9:1, and diclorometano : etanol = 4:1;
 - (6.3) recoger 3~5 fracciones de las que fluyen desde la columna de gel de sílice;
 - (6.4) analizar las fracciones recogidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina;
 - 25 (6.5) mezclar las fracciones recogidas en el paso previo para formar una fracción específica que contenga monascina y ankaflavina;
 - (7.1) lavar y separar la fracción específica que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso (6) por columna C₁₈ en combinación con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y una solución de lavado metanol:agua = 85:15;
 - 30 (7.2) recoger dos fracciones de las que fluyen de la columna C₁₈; y
 - (7.3) analizar las fracciones recogidas en el paso previo con HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina.
2. En el método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad de acuerdo al punto 1, el paso 5 se subdivide en los siguientes pasos:
 - 35 (5.1) añadir la fracción obtenida en el paso (4) a una columna Sephadex LH-20;
 - (5.2) añadir una solución de lavado metanol : acetonitrilo = 9:1 a la columna Sephadex LH-20;
 - (5.3) recoger 3~5 fracciones de las que fluyen desde la columna Sephadex LH-20;
 - (5.4) analizar las fracciones obtenidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y
 - 40 (5.5) mezclar las fracciones recogidas en el paso previo para formar la fracción de pigmento amarillo;

Donde la solución de lavado en el paso (5.2) es Metanol:Acetonitrilo=9:1.

3. Método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad. Este método consta de los siguientes pasos:
- (1) Obtener un producto fermentado con *Monascus*;
 - 5 (2) tratar el producto fermentado con *Monascus* tres veces con acetona, estando la relación producto fermentado : acetona en el rango 1:10 ~ 1:50;
 - (3) elevar la concentración del producto obtenido en el paso previo por un proceso de descompresión en un rango de temperatura entre 40°C ~60°C;
 - (4.1) añadir el producto obtenido en el paso (3) a una columna de gel de sílice;
 - 10 (4.2) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo con el paso (4.2), hexano, hexano : etanol = 9:1, hexano : etanol = 8:2, hexano : etanol = 7:3, hexano : etanol = 1:1, y etanol;
 - (4.3) recoger 12~15 fracciones de las que fluyen desde la columna de gel de sílice;
 - 15 (4.4) analizar las fracciones recogidas en el paso previo con cromatografía líquida de alta eficacia junto con una matriz de fotodiodos (HPLC-PDA), y conservar las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y
 - (4.5) mezclar las fracciones conseguidas en el paso previo para formar una fracción de pigmento;
 - (5) separar la fracción de pigmento amarillo de la fracción de pigmento con una cromatografía en columna Sephadex LH-20;
 - (6.1) añadir la fracción de pigmento obtenida en el paso (5) a una columna de gel de sílice;
 - 20 (6.2) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo con el paso (6.2), diclorometano : etanol = 95:5, diclorometano : etanol = 9:1, and diclorometano : etanol = 4:1;
 - (6.3) recoger 3~5 fracciones de las que fluyen desde la columna de gel de sílice;
 - (6.4) analizar las fracciones recogidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina;
 - 25 (6.5) mezclar las fracciones recogidas en el paso previo para formar una fracción específica que contenga monascina y ankaflavina;
 - (7.1) lavar y separar la fracción específica que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso (6) por columna C₁₈ en combinación con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y una solución de lavado metanol:agua = 85:15;
 - 30 (7.2) recoger dos fracciones de las que fluyen de la columna C₁₈; y
 - (7.3) analizar las fracciones recogidas en el paso previo con HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan ankaflavina.
4. En el método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad de acuerdo al punto 3, el paso 5 se subdivide en los siguientes pasos:
- 35 (5.1) añadir la fracción obtenida en el paso (4) a una columna Sephadex LH-20;
 - (5.2) añadir una solución de lavado metanol : acetonitrilo = 9:1 a la columna Sephadex LH-20;
 - (5.3) recoger 3~5 fracciones de las que fluyen desde la columna Sephadex LH-20;
 - (5.4) analizar las fracciones obtenidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y
 - 40 (5.5) mezclar las fracciones recogidas en el paso previo para formar la fracción de pigmento amarillo;
- Donde la solución de lavado en el paso (5.2) es Metanol:Acetonitrilo=9:1.

5. Método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad. Este método consta de los siguientes pasos:
- (1) Obtener un producto fermentado con *Monascus*;
 - 5 (2) tratar el producto fermentado con *Monascus* tres veces con acetona, estando la relación producto fermentado : acetona en el rango 1:10 ~ 1:50;
 - (3) elevar la concentración del producto obtenido en el paso previo por un proceso de descompresión en un rango de temperatura entre 40°C ~60°C;
 - (4.1) añadir el producto obtenido en el paso (3) a una columna de gel de sílice;
 - 10 (4.2) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo con el paso (4.2), hexano, hexano : etanol = 9:1, hexano : etanol = 8:2, hexano : etanol = 7:3, hexano : etanol = 1:1, y etanol;
 - (4.3) recoger 12~15 fracciones de las que fluyen desde la columna de gel de sílice;
 - 15 (4.4) analizar las fracciones recogidas en el paso previo con cromatografía líquida de alta eficacia junto con una matriz de fotodiodos (HPLC-PDA), y conservar las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y
 - (4.5) mezclar las fracciones conseguidas en el paso previo para formar una fracción de pigmento;
 - (5) separar la fracción de pigmento amarillo de la fracción de pigmento con una cromatografía en columna Sephadex LH-20;
 - (6.1) añadir la fracción de pigmento obtenida en el paso (5) a una columna de gel de sílice;
 - 20 (6.2) añadir una serie de soluciones de lavado a la columna de gel de sílice de forma secuencial, de acuerdo con el paso (6.2), diclorometano : etanol = 95:5, diclorometano : etanol = 9:1, and diclorometano : etanol = 4:1;
 - (6.3) recoger 3~5 fracciones de las que fluyen desde la columna de gel de sílice;
 - (6.4) analizar las fracciones recogidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina;
 - 25 (6.5) mezclar las fracciones recogidas en el paso previo para formar una fracción específica que contenga monascina y ankaflavina;
 - (7.1) lavar y separar la fracción específica que contiene monascina y ankaflavina obtenida en el paso (6) por columna C₁₈ en combinación con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y una solución de lavado metanol:agua = 85:15;
 - 30 (7.2) recoger dos fracciones de las que fluyen de la columna C₁₈; y
 - (7.3) analizar las fracciones recogidas en el paso previo con HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan ankaflavina.
 - (8) mezclar la monascina y la ankaflavina de acuerdo a una proporción específica entre 1:1 y 10:1, siendo el valor óptimo de la proporción 3.56:1.
 - 35 6. En el método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad de acuerdo al punto 5, la composición contiene monascina y ankaflavina, ambos pigmentos amarillos del *Monascus* extraídos de un producto fermentado de *Monascus*, en el que la proporción de contenido de la monascina en relación a la ankaflavina es de 1:1 a 10:1.
 - 40 7. En el método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad de acuerdo al punto 6, la proporción óptima entre el contenido de monascina y ankaflavina es 3.56:1.
 8. En el método de elaboración de un compuesto para reducir los lípidos en sangre y elevar la concentración de lipoproteína de alta densidad de acuerdo al punto 5, el paso (5) se subdivide a su vez en los siguientes pasos:
 - (5.1) añadir la fracción obtenida en el paso (4) a una columna Sephadex LH-20;

ES 2 529 684 T3

(5.2) añadir una solución de lavado metanol : acetonitrilo = 9:1 a la columna Sephadex LH-20;

(5.3) recoger 3~5 fracciones de las que fluyen desde la columna Sephadex LH-20;

(5.4) analizar las fracciones obtenidas en el paso previo por HPLC-PDA, y recoger las fracciones que contengan monascina y ankaflavina; y

5 (5.5) mezclar las fracciones recogidas en el paso previo para formar la fracción de pigmento amarillo;

Donde la solución de lavado en el paso (5.2) es Metanol:Acetonitrilo=9:1.

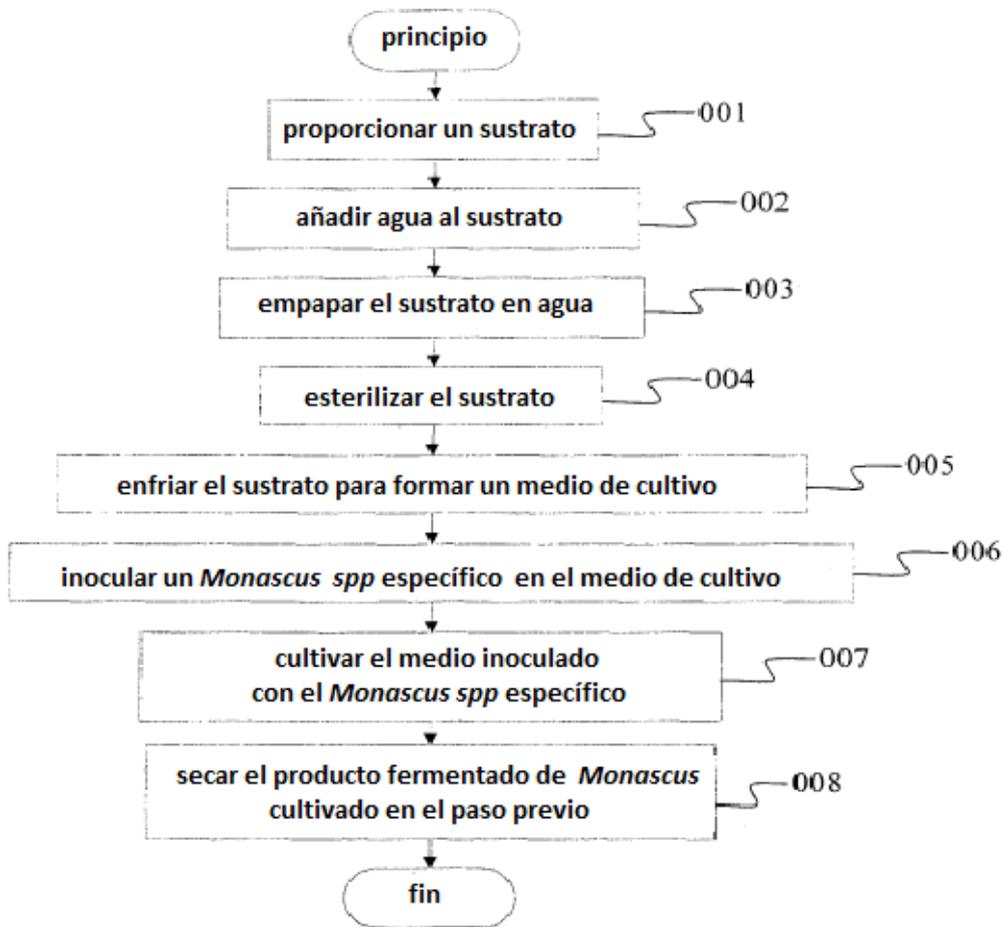


FIG. 1

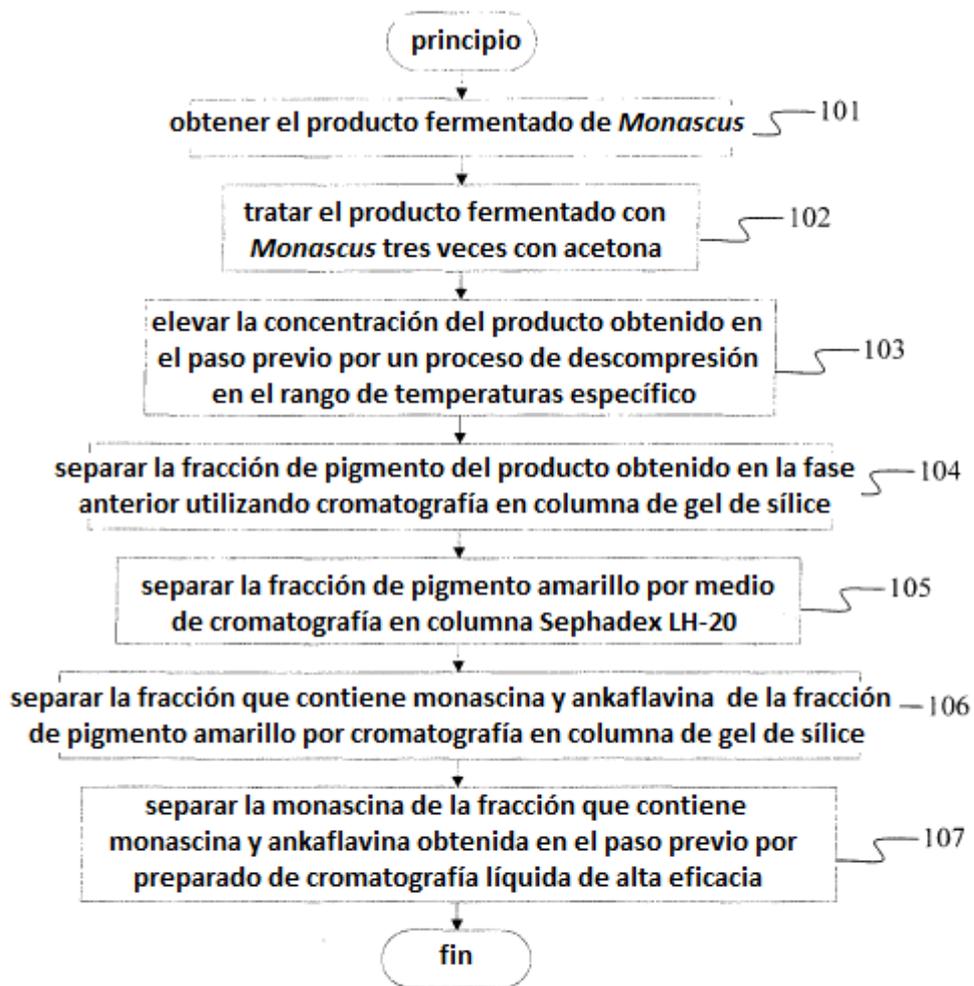


FIG. 2

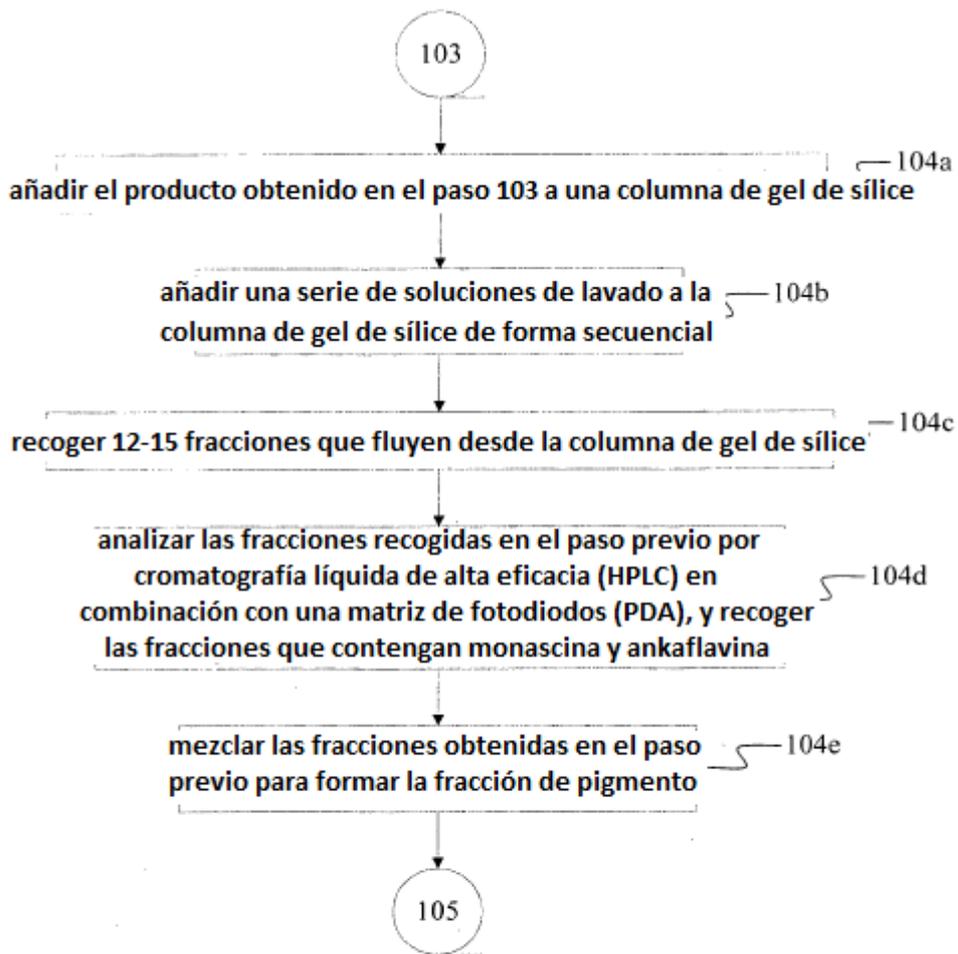


FIG. 3

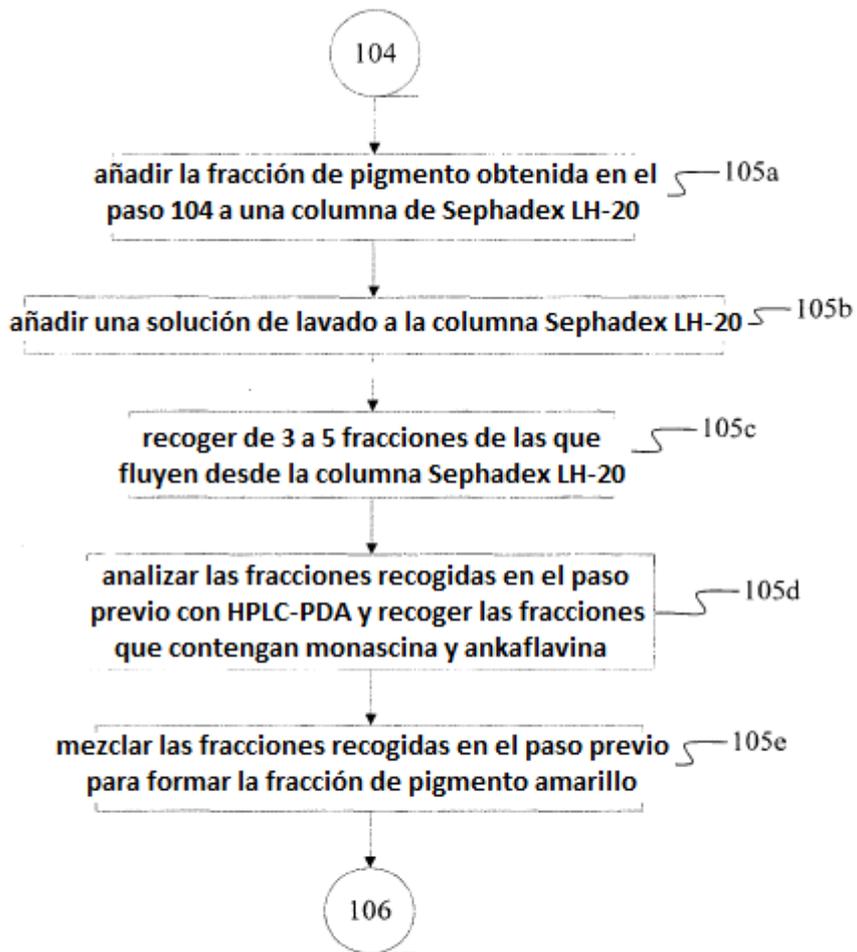


FIG. 4

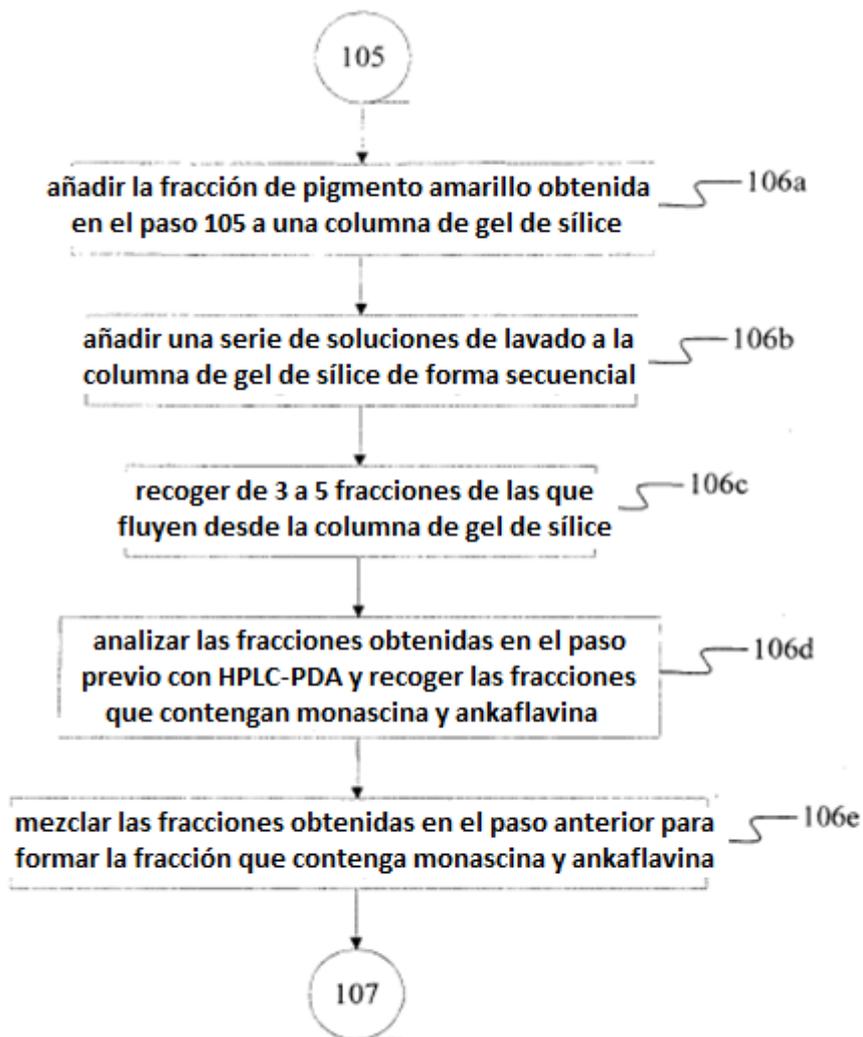


FIG. 5

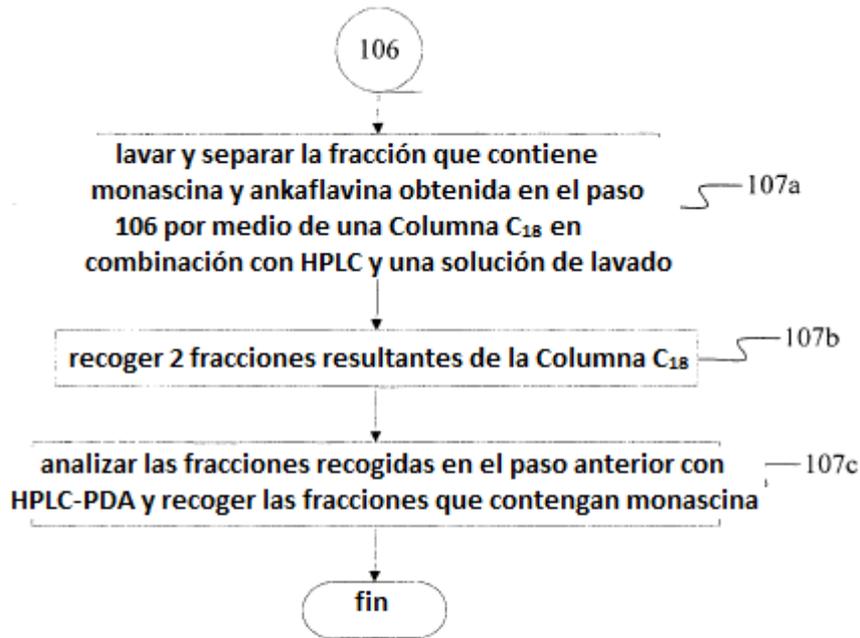


FIG. 6

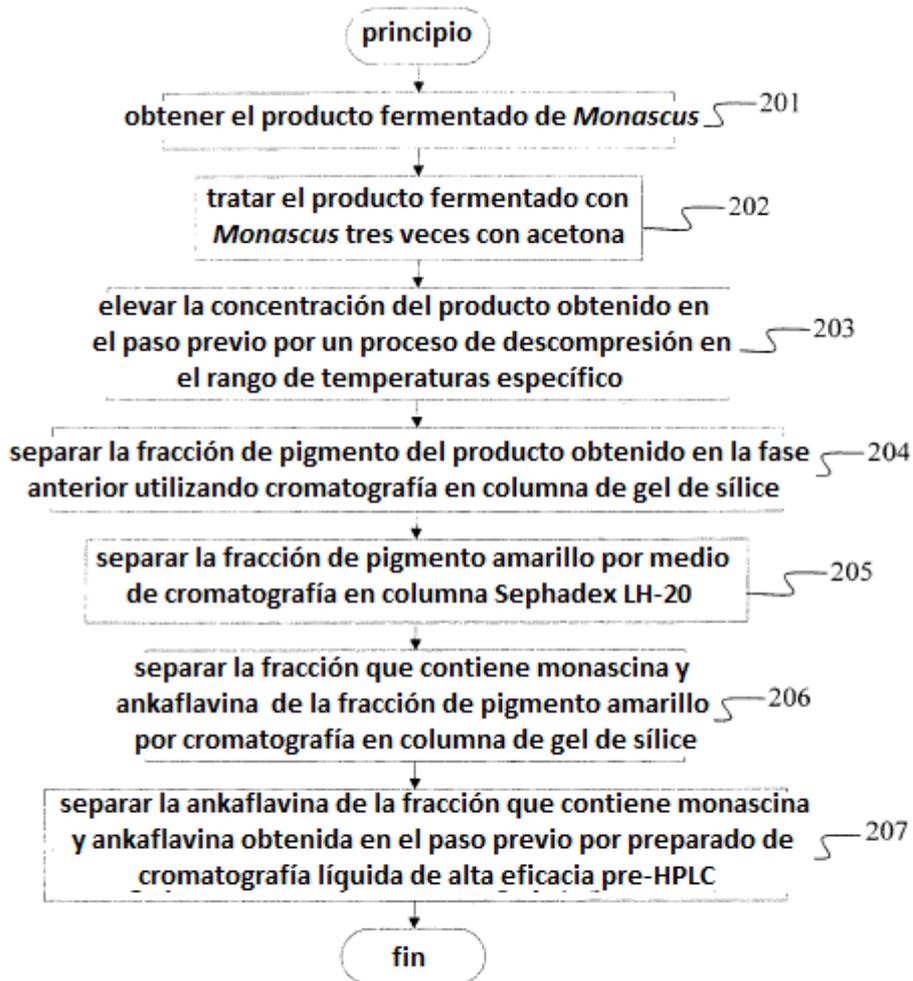


FIG. 7

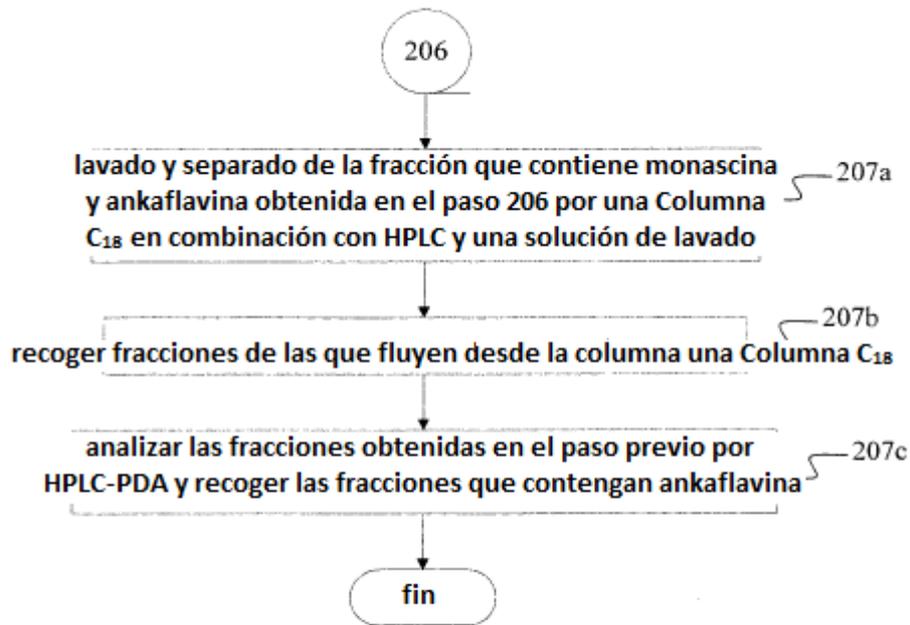


FIG. 8

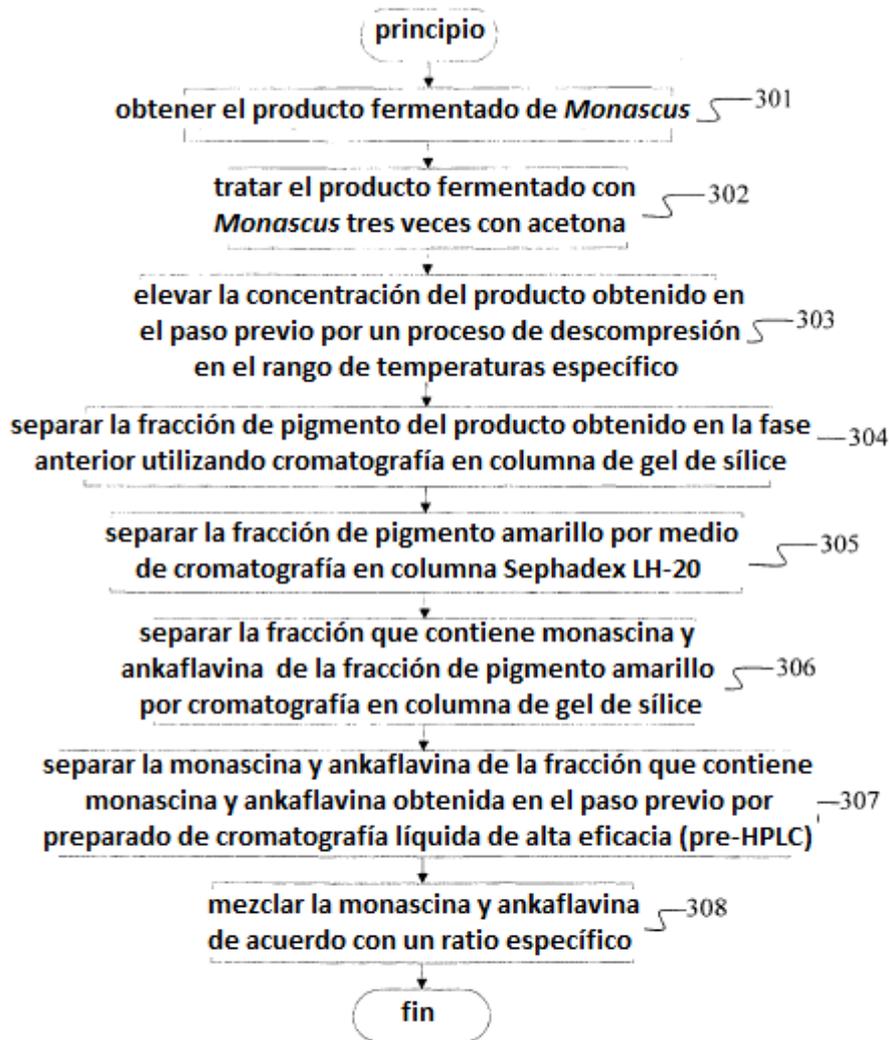


FIG. 9

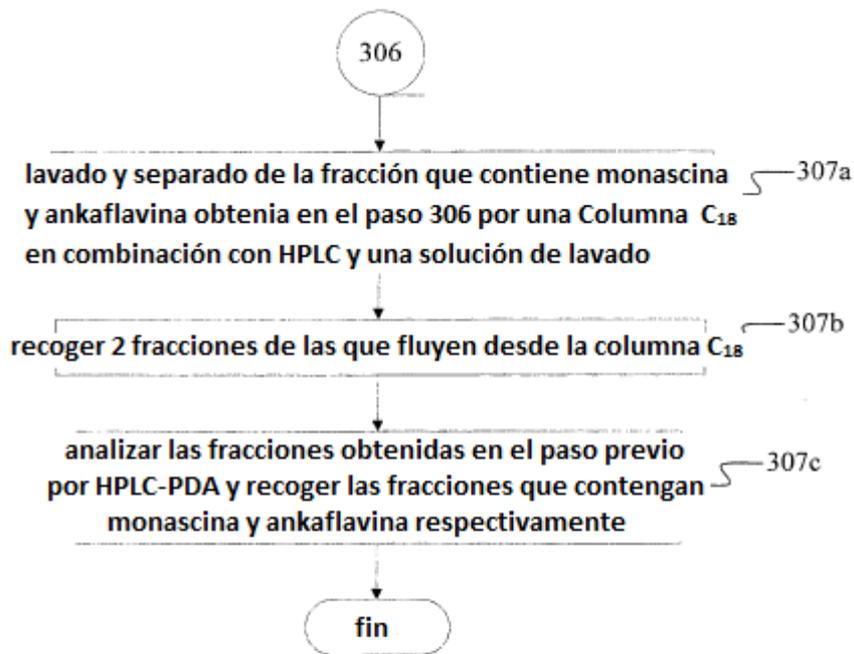


FIG. 10

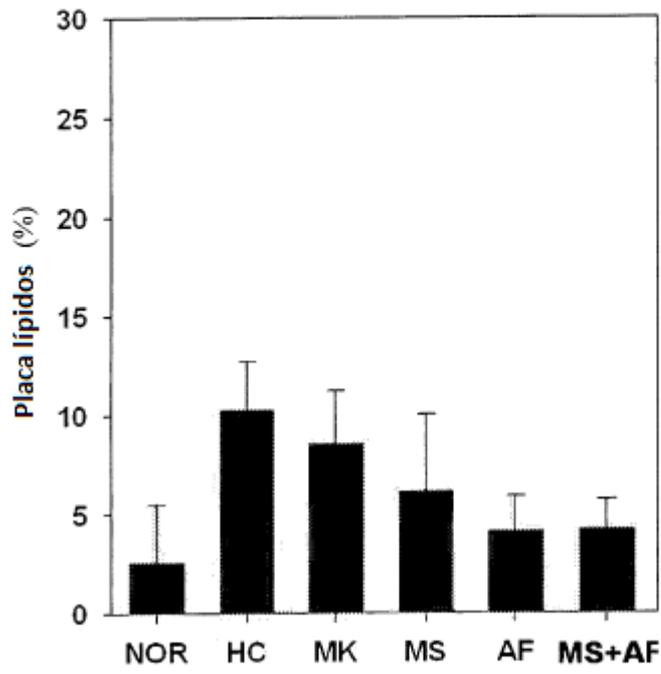


FIG. 11

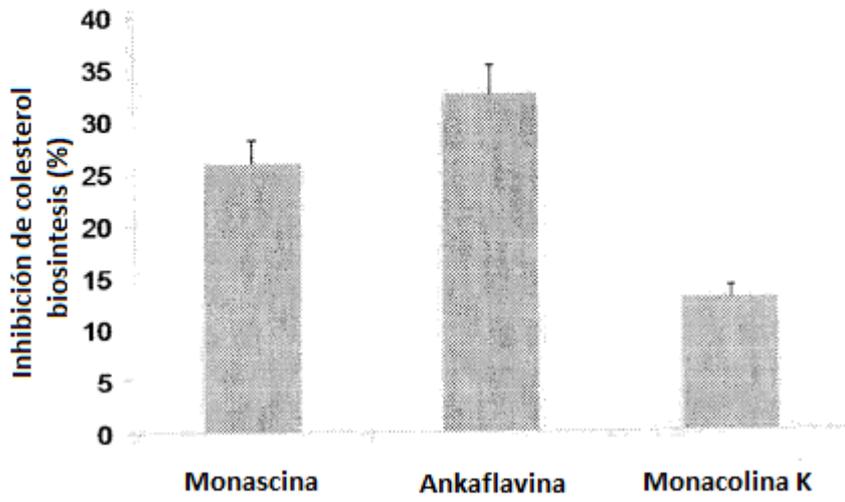


FIG. 12