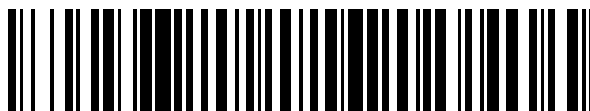


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 142**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 35/745 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012** **PCT/IB2012/000907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012** **WO12153179**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012** **E 12731650 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2707010**

54 Título: **Cepas bacterianas que pertenecen al género Bifidobacterium para su uso en el tratamiento de la hipercolesterolemia**

30 Prioridad:

09.05.2011 IT MI20110792

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

12.05.2017

73 Titular/es:

PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)

Via Mattei, 3

28100 Novara (NO), IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI;

STROZZI, GIAN PAOLO y

MOGNA, LUCA

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 612 142 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

Cepas bacterianas que pertenecen al género *Bifidobacterium* para su uso en el tratamiento de la hipercolesterolemia

La presente invención se refiere a cepas bacterianas seleccionadas que pertenecen al género *Bifidobacterium* para su uso en el tratamiento de la hipercolesterolemia. En particular, la presente invención se refiere a una composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica que comprende dichas cepas bacterianas en asociación con esteroides o fitoesteroides y/o estanoles o fitoestanoles y/o glucomanano y/o goma konjac y/o fibras prebióticas y/o arroz rojo fermentado y/o betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y/o gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada.

Se conoce bien que todas las células del organismo son capaces de sintetizar colesterol a partir de acetil coenzima A, pero la mayor parte del colesterol se produce en los peroxisomas de las células hepáticas, que lo transfieren a la sangre para que se transporte por todo el organismo.

Cuando se habla de "colesterol" en medicina, no quiere decirse colesterol como producto químico, sino más bien se habla realmente de una clase de lipoproteínas (quilomicrones, agregados de transporte) que circulan en la sangre. La concentración de las lipoproteínas mencionadas anteriormente se denomina colesterol en sangre. Dependiendo de su composición en cuanto a colesterol, fosfolípidos, proteínas, triglicéridos y ácidos grasos, estos agregados se diferencian además en varias clases (según el peso específico, comprendido entre 0,98 y 1,17 g/cm³): VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), LDL (lipoproteínas de baja densidad), HDL2 y HDL3.

La biosíntesis de colesterol se regula mediante la concentración intracelular de colesterol y mediante las hormonas insulina y glucagón, de modo que el colesterol se sintetiza solo en caso de necesidad para evitar que se malgaste la energía. De hecho, una concentración intracelular de colesterol elevada asociada con las hormonas insulina y glucagón inhibe la enzima HMG-CoA reductasa, de modo que se bloquea la biosíntesis de colesterol nuevo. Por este motivo, la cantidad de colesterol sintetizada es inversamente proporcional a la cantidad de colesterol tomada a través de la dieta.

En el caso de una dieta hipercolesterolémica, la cantidad de colesterol sintetizada mediante la biosíntesis de colesterol disminuye, pero los parámetros de análisis del colesterol pueden exceder, no obstante, los valores umbral recomendados por la Organización Mundial de la Salud: colesterol en sangre total por debajo de 200 mg/dl y una razón de HDL/colesterol total de menos de 5 (para varones) y menos de 4,5 (para mujeres). Aproximadamente, se admite lo siguiente:

i) Niveles normales de colesterol en sangre, con un valor de menos de 200 mg/dl de colesterol en sangre.

ii) Hipercolesterolemia leve, con un valor comprendido entre 200 y 249 mg/dl.

iii) Hipercolesterolemia moderada, con un valor comprendido entre 250 y 299 mg/dl.

iv) Hipercolesterolemia grave, con un valor superior a 300 mg/dl.

El hecho de exceder los valores umbral (200 mg/dl) de los parámetros de análisis del colesterol limita a muchas personas en la elección de los alimentos que pueden comer y en el estilo de vida que pueden mantener. Estas limitaciones/privaciones también pueden tener consecuencias en el estado de ánimo de las propias personas, que se ven privadas de la libertad de elegir qué comer puesto que son conscientes del hecho de que la elección de tomar un plato con un alto contenido en colesterol implica o bien una serie de sacrificios en los siguientes días o bien, en algunos casos, un sentimiento de culpabilidad por haber "desobedecido" o contribuido a aumentar los valores de colesterol en sangre.

Por tanto, sería útil y deseable tener una composición capaz de normalizar los parámetros de análisis del colesterol en sujetos que se permiten alimentos con un contenido alto en colesterol de vez en cuando.

Se conoce bien la existencia de fármacos, tales como las estatinas, que inhiben la síntesis de colesterol endógeno actuando sobre la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, una enzima que convierte las moléculas de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en ácido mevalónico, un precursor del colesterol.

Un problema que se deriva de la ingesta de dichos fármacos, por ejemplo las estatinas, radica en el hecho de que al reducir el nivel de colesterol endógeno dichos fármacos contribuyen a aumentar la biosíntesis de colesterol intracelular.

Un aumento de la biosíntesis de colesterol intracelular significa que cuando un paciente deja de tomar estatinas, por ejemplo, la biosíntesis de colesterol intracelular no se normaliza (reduce) inmediatamente tras la interrupción de la ingesta de las estatinas, sino más bien continúa como si el paciente estuviera tomando todavía el fármaco (se dice

que es un “memoria pasada”).

Por tanto, una vez que la ingesta de estatinas, por ejemplo, se interrumpe, la biosíntesis de colesterol intracelular tarda una determinada cantidad de tiempo antes de normalizarse, es decir antes de reducir dicha biosíntesis hasta los niveles que existían antes de que comenzase la ingesta del fármaco a base de estatina. Esta producción incontrolada e innecesaria de colesterol representa un serio inconveniente.

Por tanto, sería deseable disponer de un tratamiento alternativo a las estatinas, por ejemplo, pero no solo eso. El tratamiento exigido debe ser un tratamiento que el sujeto pueda interrumpir libremente sin ninguna producción de colesterol adicional. En términos prácticos, sería deseable disponer de un nuevo tratamiento que, por un lado, sea capaz de reducir el nivel de colesterol endógeno y, por otro lado, en el caso de que el propio tratamiento se interrumpa, sea capaz de normalizar la biosíntesis de colesterol intracelular así como normalizar el nivel fisiológico de colesterol.

El solicitante ha proporcionado una respuesta a las necesidades mencionadas anteriormente siguiendo una intensa actividad de investigación, al final de la cual se identificó, a partir de un enorme conjunto de cepas, una selección de cepas bacterianas que pertenecen al género *Bifidobacterium*. Dichas cepas presentan una notable capacidad de reducir el nivel de colesterol en sangre, en particular el nivel de colesterol de LDL.

La materia objeto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana que pertenece al género *Bifidobacterium* y que tiene las características divulgadas en la reivindicación adjunta.

Dicha cepa pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum*. El solicitante llevó a cabo una selección sobre muchas cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Bifidobacterium bifidum*. Las cepas seleccionadas por sus propiedades son:

(i) *Bifidobacterium bifidum* BB06 depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.03.2011, con el número de registro DSM 24688.

(ii) *Bifidobacterium bifidum* MB109 depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.06.2010, con el número de registro DSM 23731.

El solicitante llevó a cabo una selección sobre muchas cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Bifidobacterium lactis*. Las cepas seleccionadas por sus propiedades son:

(i) *Bifidobacterium lactis* MB2409 depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.06.2010, con el número de registro DSM 23733.

(ii) *Bifidobacterium lactis* BS07 (MB243) depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.03.2011, con el número de registro DSM 24690.

El solicitante llevó a cabo una selección sobre muchas cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Bifidobacterium breve*. La cepa seleccionada por sus propiedades es *Bifidobacterium breve* MB113 depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.06.2010, con el número de registro DSM 23732.

El solicitante llevó a cabo una selección sobre muchas cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Bifidobacterium infantis*. La cepa seleccionada por sus propiedades es *Bifidobacterium infantis* B102 (MB287) depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.03.2011, con el número de registro DSM 24687.

En el contexto de la presente invención, las bacterias pueden estar presentes en forma aislada o con el sobrenadante respectivo. Pueden estar presentes en forma de bacterias vivas o muertas o componentes de las mismas o como un extracto celular o un extracto enzimático.

La materia objeto de la presente invención se refiere a una composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica que tiene las características divulgadas en la reivindicación adjunta.

La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica comprende una mezcla de cepas bacterianas tal como se reivindica en la reivindicación 1.

La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica comprende una mezcla de cepas bacterianas que consiste en al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en:

(1) *Bifidobacterium bifidum* BB06 (MB107) depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.03.2011, con el número de registro DSM 24688; y/o

(2) *Bifidobacterium bifidum* MB109 depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.06.2010, con el número de registro DSM 23731; y/o

5 (3) *Bifidobacterium lactis* MB2409 depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.06.2010, con el número de registro DSM 23733, y/o

(4) *Bifidobacterium breve* MB113 depositada por la empresa Probiotical S.p.A de Novara (Italia) en la DSMZ el 29.06.2010, con el número de registro DSM 23732.

10 La materia objeto de la presente invención se refiere a una composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica que comprende una composición bacteriana que consiste en (i) al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum* capaz de adsorber colesterol sobre su pared celular de superficie, y (ii) al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium lactis* o *Bifidobacterium breve* capaz de hidrolizar sales biliares a un nivel intracelular y/o extracelular, para su uso en el
15 tratamiento preventivo o curativo de la hipercolesterolemia.

La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica está destinada al uso para reducir el nivel de colesterol de LDL en la sangre. Además, dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum* se selecciona del grupo que consiste en la cepa bacteriana *B. bifidum* BB06 (MB107) DSM 24688 y la cepa bacteriana *B. bifidum* (MB109) DSM 23731. Además, dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium lactis* se selecciona del grupo que consiste en la cepa bacteriana *B. lactis* (MB2409) DSM 23733. Además, dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve* es la cepa bacteriana *B. breve* (MB113) DSM 23732. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición
20 farmacéutica comprende además una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* capaz de producir ácido linoleico conjugado (CLA) a partir de ácido linoleico (LA). Además, dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* es *Bifidobacterium longum* (BL04) DSM 23233.

La materia objeto de la presente invención se refiere a una composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica que comprende una composición bacteriana que consiste en al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum*, al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium lactis* y al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum*, para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de hipercolesterolemia. Dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum* se selecciona del grupo que consiste en la cepa bacteriana *B. bifidum* BB06 (MB107) DSM 24688 y la cepa bacteriana *B. bifidum* (MB109) DSM 23731; preferiblemente es la cepa bacteriana *B. bifidum* (MB109) DSM 23731. Además, dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium lactis* se selecciona del grupo que consiste en la cepa bacteriana *B. lactis* (MB2409) DSM 23733. Además, dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* es *Bifidobacterium longum* (BL04) DSM 23233.

40 En la composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica está presente adicionalmente al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende esteroides o fitoesteroides, estanoles o fitoesteroides, glucomanano, goma konjac y/o al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende fructo-oligosacáridos-FOS, galacto-oligosacáridos-GOS, xilo-oligosacáridos-XOS, inulina, fibras de alerce o arabinogalactano y/o arroz rojo fermentado y/o betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y/o gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada.

En la composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica está presente adicionalmente: (i) al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende esteroides o fitoesteroides y/o estanoles o fitoesteroides en asociación con al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende glucomanano, goma konjac, arroz rojo fermentado, betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada;

(ii) al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende esteroides o fitoesteroides y/o estanoles o fitoesteroides en asociación con al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende glucomanano, goma konjac, arroz rojo fermentado, betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada en asociación con al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende FOS, GOS, XOS, inulina, fibra de alerce o arabinogalactano.

Ventajosamente, la composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica comprende una mezcla de cepas bacterianas que comprende o, como alternativa, que consiste en al menos dos cepas bacterianas. Al menos una primera cepa debe tener un mecanismo de adsorción no específica de colesterol (adsorción de colesterol sobre la pared celular de superficie de la bacteria), mientras que al menos una segunda cepa debe tener una actividad enzimática de BSH (hidrolasa de sales biliares) específica.

65 La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica de la presente invención tiene aplicación válida en el tratamiento preventivo o curativo de trastornos o patologías

relacionados con niveles altos de colesterol en sangre, es decir niveles de colesterol que exceden 200 mg/dl; y en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Las composiciones descritas anteriormente, a las que se refiere la presente invención, tienen aplicación válida en la reducción del nivel de colesterol en sangre, en particular colesterol de LDL.

En una realización preferida, la composición alimenticia o producto complementario o composición farmacéutica de la presente invención comprende, además, al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en esteroides o fitoesteroides y/o estanoles o fitoesteroides. La cantidad de esteroides/estanoles por dosis diaria de composición debe ser mayor de 0,8 g, preferiblemente de desde 1 g hasta 3 g, por ejemplo, desde 1,5 hasta 2,0 g. En una realización preferida, la composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica de la presente invención comprende además al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en glucomanano, goma konjac, arroz rojo fermentado, betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada. La cantidad de glucomanano/goma konjac por dosis diaria de composición debe ser mayor de 4 g, preferiblemente de desde 5 g hasta 10 g, por ejemplo, desde 6 hasta 8 g.

Si se usan betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada o salvado de cebada, debe garantizarse una ingesta de 3 gramos al día con el fin de contribuir a mantener niveles de colesterol en sangre normales.

En una realización preferida, la composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica de la presente invención comprende además al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en esteroides y estanoles en asociación con al menos otra sustancia de origen vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en glucomanano y goma konjac. Las dosis recomendadas diariamente se indican anteriormente.

En una realización preferida, la composición alimenticia o producto complementario o composición farmacéutica de la presente invención comprende además al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en FOS, GOS, XOS e inulina.

En una realización preferida, la composición alimenticia o producto complementario o composición farmacéutica de la presente invención comprende además al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en esteroides y estanoles en asociación con al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en FOS, GOS, XOS e inulina.

En una realización preferida, la composición alimenticia o producto complementario o composición farmacéutica de la presente invención comprende además al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en glucomanano y goma konjac en asociación con al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en FOS, GOS, XOS e inulina.

En una realización preferida, la composición alimenticia o producto complementario o composición farmacéutica de la presente invención comprende además al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en esteroides y estanoles en asociación con al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en glucomanano y goma konjac en asociación con al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en FOS, GOS, XOS, inulina.

Las composiciones descritas anteriormente tienen aplicación válida en el tratamiento de sujetos sanos que tienen un nivel de colesterol en sangre que está dentro del intervalo normal, pero que de vez en cuando, debido a la ingesta de una cantidad de grasas en la dieta, puede aumentar, dando lugar a hipercolesterolemia "temporal". En este caso, la ingesta, por esos sujetos, de una composición según la presente invención puede devolver el nivel de colesterol en sangre al intervalo normal, puesto que hay una reducción del exceso de colesterol.

Además, las composiciones descritas anteriormente también tienen aplicación válida en el tratamiento de sujetos que normalmente tienen un alto nivel de colesterol en sangre. En este caso, la ingesta, por parte de esos sujetos, de una composición según la presente invención puede limitar el aumento en el nivel de colesterol en sangre.

Tal como se muestra en las curvas de acidificación que siguen, la cepa BL04 prefiere una sustancia vegetal, tal como FOS, fibras de alerce o arabinogalactano y GOS-Gal, la cepa MB2409 prefiere una sustancia vegetal tal como FOS y GOS-Galè, y la cepa MB109 prefiere una sustancia vegetal tal como FOS e inulina.

Parte experimental

El solicitante realizó una actividad de investigación intensa con el objetivo de seleccionar las cepas bacterianas.

Estudio in vivo

Se alojaron un total de 32 ratas en jaulas. Tras varios días de aclimatación a la dieta habitual (T0), todas las ratas empezaron a recibir la misma dieta hipercolesterolemia al 100 %. Tras 15 días de esta dieta (T15), se dividieron aleatoriamente las ratas en 4 subgrupos (8 ratas por subgrupo). Las ratas comenzaron a recibir tratamientos diferenciados desde T15 hasta T45. Estos tratamientos continuaron durante 30 días hasta el sacrificio (T45):

Grupo 1: Dieta hipercolesterolemia al 30 % y *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 (Kandler *et al.*; 1982), 1×10^9 /día (referencia). Se conoce esta cepa por su capacidad para disminuir los niveles de colesterol (referencia);

Grupo 2: Dieta hipercolesterolemia al 30 % y mezcla de probióticos [*B. lactis* MB2409 DSM 23733 ($0,33 \times 10^9$ /día), *B. breve* MB113 DSM 23732 ($0,33 \times 10^9$ /día) y *B. bifidum* MB109 DSM 23731 ($0,33 \times 10^9$ /día)];

Grupo 3: Dieta hipercolesterolemia al 30 % (control).

La dosis diaria por rata fue de 1 ml de una suspensión que contenía (1×10^9 UFC/ml) de las cepas bacterianas indicadas anteriormente. Se administró la dosis a las ratas a través de una sonda gástrica.

Se tomaron muestras de sangre a T0, T15 y T45 tras ayuno. Se separó el suero de la sangre obtenida y se determinaron los siguientes parámetros séricos: a) colesterol de LDL, b) colesterol de HDL, c) colesterol total y d) triglicéridos.

Fases del estudio

Fase I. Dieta preliminar normal para todas las ratas durante 7 días (T-7).

Fase II. Dieta hipercolesterolemia al 100 % para todas las ratas desde el día cero (T0) hasta el décimo quinto día (T15).

Fase III. Dieta diferenciada, tal como se ha descrito anteriormente, para los 4 grupos desde el décimo sexto hasta el cuadragésimo quinto día (T45).

Resultados experimentales

1) Cambio en el peso corporal

El primer parámetro examinado fue el crecimiento ponderal de las ratas con el fin de verificar una ingesta de alimento correcta. Los datos demuestran que las ratas tomaron el alimento de manera correcta.

2) Efecto de la dieta hipercolesterolemia

Puesto que todas las ratas recibieron la misma dieta en esta primera fase, se agruparon todas. Entonces se realizó una comparación entre el colesterol de LDL, el colesterol de HDL, el colesterol total y los niveles de triglicéridos en sangre a tiempo cero (T0) y tras 15 días (T15). También se calculó la razón de HDL/LDL, véase la tabla 1.

Tabla 1

Parámetros en sangre	T0	T15
Colesterol de LDL (mg/dl)	18,52±1,07	22,31±3,86°
Colesterol de HDL (mg/dl)	65,22±3,10	21,85±4,50*
HDL/LDL	3,54±0,25	1,00±0,22*

El análisis estadístico se realizó con la prueba de la t de Student: ° $p < 0,01$; * $p < 0,001$.

Los datos proporcionados en la tabla 1 muestran que la dieta hipercolesterolemia dio lugar a un aumento significativo de colesterol de LDL (colesterol malo) y una disminución incluso más significativa de colesterol de HDL (colesterol bueno). La razón de HDL/LDL, que en condiciones normales debe ser mayor de 3, disminuyó mediante la dieta hipercolesterolemia.

3) Efecto de los diferentes tratamientos (grupos 1-3) sobre el colesterol de LDL

Los tratamientos 1 y 2 (grupos 1 y 2) dieron lugar a una reducción significativa de colesterol de LDL ($p < 0,001$) en comparación con los valores a T15. En el tratamiento 3 (grupo 3), basado solo en una dieta hipercolesterolemia al 30 %, los niveles de LDL no cambiaron en comparación con T15.

La cantidad de colesterol se redujo a través de dos mecanismos:

i) Mecanismo 1: Adsorción de colesterol no específica (sobre la pared celular de superficie de la bacteria)

ii) Mecanismo 2: Actividad enzimática específica de BSH (hidrolasa de sales biliares).

El solicitante llevó a cabo selección sobre un grupo muy grande de bacterias evaluando la actividad intracelular de BSH.

A efectos prácticos, se cultivó cada cepa bacteriana durante la noche en medio de cultivo MRS+cisteína, el 0,05 % en peso/volumen, y entonces se centrifugó con el fin de recoger un sedimento de células. Se lavó este sedimento dos veces con un tampón fosfato de sodio pH 6 0,1 M con el fin de eliminar la BSH extracelular.

Se resuspendieron las células en 1 ml de tampón fosfato de sodio pH 6; se lisaron con perlas de vidrio por medio de tres ciclos de vórtex de 5 minutos a velocidad máxima a 4 °C y se incubaron con hielo durante 10 minutos. Al final del tercer ciclo, se centrifugó la muestra a 13000 rpm durante 5 minutos y se precipitaron todas las macromoléculas y los residuos celulares de modo que pudiera usarse el sobrenadante, que también contiene las proteínas.

El sobrenadante se sometió a análisis para cuantificar las proteínas totales contenidas en el mismo.

Para este fin, se usó el método de Lowry para determinar la cantidad total de proteína presente en el extracto. A efectos prácticos, se añade un mililitro de reactivo de Lowry a 200 microlitros de extracto, diluido apropiadamente.

Disoluciones madre:

Lowry A: (Na₂CO₃ en NaOH 0,1 M (autoclave),

Lowry B: CuSO₄ al 1 % en H₂O (esterilizar mediante filtración),

Lowry C: tartrato Na-K tetrahidratado al 2 % en H₂O (esterilizar mediante filtración).

Reactivo de Lowry (por 50 ml-50 muestras): Lowry A 49 ml+Lowry B 0,5 ml+Lowry C 0,5 ml.

Se combinan 200 µl de muestra diluida apropiadamente + 1 ml de reactivo de Lowry a temperatura ambiente. Se dejan incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y entonces se añaden 100 microlitros de reactivo de Folin-Cicalteau diluido 1:1 en agua. Tras 30 minutos de incubación, se mide la absorbancia a 500 nm. Los datos obtenidos se interpolan a lo largo de una recta de regresión con BSA. Entonces, se determina el contenido en proteína total del extracto y se expresa en mg/ml. Se valora la actividad específica de BSH (unidades de BSH/mg de proteína total) para determinar la porción de proteínas presente en el extracto celular que presenta actividad enzimática de BSH.

Para este fin, se añaden 20 microlitros de un sustrato que contiene ácido taurodesoxicólico (TDCA) - muestra de TDCA - o ácido glicólico (GCA) - muestra de GCA - a los 20 microlitros del extracto descrito anteriormente a una concentración de 200 mM. Se añaden 360 microlitros de tampón fosfato de sodio pH 6 0,1 M. El blanco experimental se representa mediante 20 microlitros de extracto y 380 microlitros de tampón fosfato de sodio pH 6 0,1 M (muestra de blanco).

Se incuban las muestras (muestra de TDCA, muestra de GCA y muestra de blanco) a 37 °C. Se repite esto para el extracto obtenido de cada cepa. Tras 10 y 30 minutos de incubación, se recogen 100 microlitros de las muestras descritas anteriormente y se añaden 100 microlitros de TCA (ácido tricloroacético al 15 %) para precipitar las proteínas. A esto le siguen 5 minutos de centrifugación a 13000 rpm con el fin de obtener una mezcla ácida y se recoge el sobrenadante, que contendrá los aminoácidos glicina y taurina.

Se analizaron 50 microlitros de mezcla ácida (para cada mezcla ácida obtenida, es decir muestra de blanco, muestra de TDCA y muestra de GCA) recogida a 10 y 30 minutos como tales y diluidas 1:5. En detalle, se evaluaron las muestras como tales usando las razones de 50 microlitros de mezcla ácida y 950 microlitros de mezcla de ninhidrina, mientras que se evaluó la dilución 1:5 añadiendo 10 microlitros de mezcla ácida a 40 microlitros de agua desmineralizada y añadiendo 950 microlitros de mezcla de ninhidrina. Se preparó la mezcla de ninhidrina tal como sigue: 2 mililitros de ninhidrina al 1 % en un tampón de citrato pH 5,5 0,5 M; 4,8 mililitros de glicerol y 0,8 mililitros de tampón de citrato pH 5,5 0,5 M. Se sometieron a ebullición las muestras durante 14 minutos y se enfriaron durante 3 minutos en agua. Se leyó la absorbancia de cada muestra a 570 nanómetros.

Cuantificar la taurina y glicina requiere una curva de calibración específica a una concentración patrón de taurina o glicina.

Determinación de las unidades de actividad enzimática de BSH por ml de extracto:

- U/ml = micromoles de taurina o glicina liberadas por minuto/ml = [Abs 570 de la muestra desconocida – Abs

570 del blanco]/10 minutos]·1/[(1,25 x 1000) · (factor de dilución 1 ó 5)

Las unidades (U) de BSH / ml de extracto se transforman en unidades (U) de BSH / mg de proteínas totales basándose en la concentración de proteína total determinada usando el método de Lowry.

Al final de esta selección llevada a cabo sobre todas las cepas (por determinación de la actividad específica de BSH (Lowry y ninhidrina) se llevó a cabo un análisis adicional, que consistía en la determinación de la biotransformación de GCA con células completas, puesto que esto representa “una actividad extracelular”.

A efectos prácticos, se lleva a cabo un cultivo en caldo durante la noche en MRS + cisteína al 0,05 % en peso/volumen y entonces se mide la DO a 600 nanómetros con el fin de normalizar la concentración celular.

Se prepara un blanco que contenía MRS+cisteína al 0,05 %. Se añaden 20 microlitros de una disolución 200 mM de ácido glicólico (GCA) a 1 ml de cada muestra; seguido entonces de incubación a 37 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se recogen 100 microlitros y se añaden 100 microlitros de ácido tricloroacético al 15 % para interrumpir la reacción. Entonces se centrifugan las muestras a 12000 rpm durante 5 minutos para separar las células completas y las proteínas; se diluyen 25 veces con agua desmineralizada y se inyectan en una HPLC-EM para calcular el % de conversión en comparación con la muestra de blanco.

Condiciones de funcionamiento de HPLC:

Columna: Zorbax Eclipse,

velocidad de flujo: 0,2 ml/min,

inyección: 1 µl,

λ = 200 nm,

disolvente: A = H₂O dd; B = ACN,

gradiente: B % T (min); 10 %, 5 min; 100 %, 30 min; 100 %, 50 min; 10 %, 55 min.

Tiempo de retención: GCA (PM = 464):33,04 min; CA (PM = 407): 35,41 min.

Condiciones de funcionamiento de EM (espectrometría de masas):

Polaridad: negativa,

tiempo de ad.: 300,

corriente de capilaridad: 3500 V,

nebulizador: 30 psi,

gas seco: 8,0 l/min,

temp. seca: 325 °C,

T (min): 0-30, 30-40, 40-55.

Se realiza un cálculo del % de conversión, es decir de cuánto CA y GCA está presente, con el fin de determinar la presencia de BSH extracelular.

Por tanto, se seleccionaron las 32 cepas iniciales considerando el valor de BSH intracelular (método de Lowry y ensayo de ninhidrina) y la bioconversión de GCA en CA - BSH extracelular (cromatografía HPLC + EM), véase la tabla 2.

Tabla 2

Bacteria	% de bioconversión (actividad de BSH extracelular)		% de bioconversión de GCA promedio	actividad de BSH intracelular promedio frente a GCA	Desv. est.
<i>L. reuteri</i> NCIMB	98	82,7	90,4	1,12	0,13

701359					
<i>B. lactis</i> DSM 24690	100	100	100	0,59	0,15
<i>B. lactis</i> DSM 23733	79,8	63,9	71,9	0,77	0,20
<i>B. bifidum</i> DSM 23731	64,2	71,2	67,7	0,10	0,03
<i>B. breve</i> DSM 23732	14,7	14,7	14,7	1,18	0,29
<i>B. infantis</i> DSM 24687	6,6	6,9	6,8	0,67	0,06
<i>B. Bifidum</i> DSM 24688	---	---	---	0,15	0,07

Las cepas se sometieron a prueba posteriormente con el fin de determinar su capacidad para reducir el colesterol mediante adsorción.

- 5 Se evaluó la capacidad de adsorción de colesterol cultivando las cepas en medio MRS + cisteína, al que se le añadieron 100 miligramos/litro de colesterol. Se incubaron los cultivos a 37 °C durante 48 horas. 24 y 48 horas tras el inicio de la incubación, se tomaron muestras y se analizó el colesterol que quedaba en el sobrenadante mediante HPLC. Se calculó el colesterol adsorbido sobre las células y se comparó con un control no inoculado (medio MRS + cisteína + 100 mg/l de colesterol). También se consideró el % de colesterol adsorbido en relación con la densidad óptica del cultivo (% de colesterol adsorbido/DO), ya que esta razón expresa la capacidad de la célula para adsorber el colesterol sobre su membrana. Las concentraciones de colesterol de de las muestras desconocidas se determinaron por medio de una curva de calibración con concentraciones de colesterol conocidas (desde 0,00 mg/l hasta 100 mg/l).

15 Método de HPLC

Columna: Zorbax Eclipse XBD-C18 de resolución rápida HT 4,6 x 50 mm 1,8 µm,

Fase móvil: ACN,

20 Flujo de DAD: 200 nm,

t_R del colesterol: 4,0 min

25 Condiciones de cultivo

Medio

Glucosa: 20 g/l,

30 Peptona proteosa n.º 3 de Bacto, 10 g/l,

extracto de ternera de Bacto: 10 g/l,

35 extracto de levadura de Bacto: 5 g/l,

acetato de sodio 5 g/l,

K₂HPO₃: 2 g/l,

40 citrato de amonio: 2 g/l,

MgSO₄: 0,1 g/l,

45 MnSO₄: 0,05 g/l,

cisteína: 0,5 g/l,

mezcla de colesterol-Tween 80

50 Esterilizar en autoclave a 110 °C durante 30 minutos.

Condiciones de crecimiento

Inoculación del 10 % a partir del cultivo durante la noche,

5 T=37 °C

Condiciones anaerobias en gas,

colesterol inicial 0,08 g/l

10

Tiempo = 18 horas

En la tabla 3 se muestran los valores de adsorción de colesterol.

15

Tabla 3

Bacteria	DO		% de adsorción		% de adsorción/DO		Promedio
	1	2	1	2	1	2	
<i>L. reuteri</i> NCIMB 701359	6,5	5,5	19,1	18,5	2,9	3,4	3,1
<i>B. bifidum</i> DSM 24688	1,6	1,5	55,9	43,5	34,4	29,9	32,2
<i>B. bifidum</i> DSM 23731	2,3	3,4	49,4	46,9	21,1	14,0	20,1
<i>B. lactis</i> DSM 23733	2,7	2,2	18,6	17,7	6,8	8,2	7,5
<i>B. breve</i> DSM 23732	1,0	1,3	6,9	8,9	7,3	6,6	7,0
<i>B. infantis</i> DSM 24687	10,4	9,8	32,9	28,1	3,2	2,9	3,0
<i>B. lactis</i> DSM 24690	2,1	2,2	18,4	13,0	8,8	6,0	7,4

La cepa *B. bifidum* BB06 (MB107) DSM 24688 y la cepa *B. bifidum* MB109 DSM 23731 muestran una alta capacidad de adsorción de colesterol. Estas dos cepas absorben una gran cantidad en comparación con *L. reuteri* NCIMB 701359 de referencia.

20

En una realización preferida, la composición de la presente invención comprende o, como alternativa, consiste en al menos una cepa que tiene una alta capacidad de adsorción de colesterol, seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa que consiste en *B. bifidum* BB06 (MB107) DSM 24688 y *B. bifidum* MB109 DSM 23731, que muestran una alta capacidad de adsorción de colesterol, en asociación con al menos una cepa que tiene una actividad de BSH intracelular y/o extracelular, seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en *B. lactis* MB2409 DSM 23733, *B. breve* MB113 DSM 23732, *B. infantis* BI02 (MB287) DSM 24687 y *B. lactis* BS07 (MB243) DSM 24690. Dicha composición puede comprender además esteroides y/o estanoles y/o glucomanano y/o goma konjac y/o fibras prebióticas, tal como se ha descrito anteriormente.

25

30

En una realización preferida, la composición de la presente invención comprende o, como alternativa, consiste en al menos una cepa que tiene una alta capacidad de adsorción de colesterol, seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa que consiste en *B. bifidum* BB06 (MB107) DSM 24688 y *B. bifidum* MB109 DSM 23731, que muestran una alta capacidad de adsorción de colesterol, en asociación con al menos una cepa que tiene una actividad de BSH intracelular y/o extracelular, seleccionada del grupo que comprende o, como alternativa, que consiste en *B. lactis* MB2409 DSM 23733 (actividad de BSH intracelular y extracelular) y *B. breve* MB113 DSM 23732 (alta actividad de BSH intracelular). Ventajosamente, dicha composición comprende la cepa *B. bifidum* MB109 DSM 23731 en asociación con *B. lactis* MB2409 DSM 23733. Dicha composición puede comprender además esteroides y/o estanoles y/o glucomanano y/o goma konjac y/o fibras prebióticas, tal como se ha descrito anteriormente.

35

40

En una realización preferida, la composición comprende, o como alternativa consiste en, *B. bifidum* MB109 DSM

23731 en asociación con *B. lactis* MB2409 DSM 23733. Dicha composición puede comprender además esteroides y/o estanoles y/o glucomanano y/o goma konjac y/o fibras prebióticas, tal como se ha descrito anteriormente.

Las composiciones descritas anteriormente, a las que se refiere la presente invención, tienen aplicación válida para reducir el nivel de colesterol en sangre, en particular colesterol de LDL.

Las composiciones descritas anteriormente, a las que se refiere la presente invención, tienen aplicación válida en el tratamiento preventivo o curativo de trastornos o patologías relacionados con altos niveles de colesterol en sangre, niveles de colesterol por encima de 200 mg/dl; y en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

Estudio clínico

Se realizó un estudio de eficacia clínica usando un comprimido de placebo que contenía fructo-oligosacáridos (FOS) y dióxido de silicio (polvo total/cápsula = 280,6 mg) y un comprimido que contenía *B. lactis* MB 2409 DSM23733, *B. bifidum* MB 109 DSM 23731 y *B. longum* BL 04 DSM 23233 y dióxido de silicio (polvo total/cápsula = 280,6 mg).

Sustancialmente, se combinaron dos cepas con actividad hipercolesterolemia y la cepa que mejor transformaba ácido linoleico (LA) en ácido linoleico conjugado (CLA).

Tipo de estudio: cruzado aleatorizado de doble ciego frente a placebo. Se planeó el cruce para que tuviera lugar tras 75 días (15 días con 2 cápsulas/día + 60 días con 1 cápsula/día). La duración total del estudio fue de 150 días. Carga garantizada al final del periodo: 1 billón/cepa/cápsula. La dosificación proporcionada en el estudio para cada tratamiento (agente activo o placebo) fue la siguiente: 2 cápsulas/día durante los primeros 15 días, 1 cápsula/día durante los siguientes 60 días; tras el cruce, de nuevo 2 cápsulas/día durante los primeros 15 días, 1 cápsula/día durante los siguientes 60 días. El estudio clínico confirmó la eficacia de la composición bacteriana sometida a prueba en la reducción del nivel de colesterol en sangre en tanto como el 25 %.

Determinación de las curvas de acidificación para las cepas *B. bifidum* MB109 DSM 23731, *B. lactis* MB2409 DSM 23733 y *B. longum* BL04 DSM 23233 (tablas 4, 5, 6 y figuras 1, 2, 3).

Se reactivaron las cepas MB109, MB2409 y BL04 antes del experimento mediante subcultivo en TPY + Cys-HCl al 1 % y se incubaron en anaerobiosis a 37 °C. Se repitieron las etapas de reactivación tres veces antes del experimento con incubación durante la noche. Al final de la tercera etapa de reactivación se sedimentaron las células, se lavaron con agua estéril y se resuspendieron antes de la inoculación en el medio complementado con fibra. El medio usado se basa en MRS libres de azúcar (fuentes de carbono) complementado respectivamente con:

- Glucosa (disolución esterilizada mediante tratamiento térmico, 121 °C 15'), medio de control.
- FOS (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 µl).
- GOS-Glu-galacto-oligosacáridos con residuo de glucosa (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 µl).
- GOS-Gal-galacto-oligosacáridos con residuo de galactosa (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 µl).
- XOS (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 µl).
- Larex-fibra de alerce o arabinogalactano (disolución esterilizada mediante tratamiento térmico, 121 °C 15').
- Inulina (disolución esterilizada mediante tratamiento térmico, 121 °C 15').

La concentración final de fuentes de carbono para todos los medios fue de 20 g/l. Entonces se inocularon los medios así compuestos con el 4 % de las cepas MB109, MB2409 y BL04 (con la adición de Cys-HCl al 1 %) y se incubaron a 37 °C en aerobiosis. Se midieron los valores de pH a tiempo 0 y a las 3, 6, 8 y 10 horas con el fin de construir las curvas de acidificación mostradas en las gráficas.

Tabla 4

		0	3	6	8	10
BL04	Glu	6,5	6,4	6,35	6,27	6,28
	Fos	6,5	6,35	6,09	5,88	5,87
	Xos	6,49	6,35	6,22	6,11	6,12
	Gos-gal	6,49	6,35	6,16	5,99	5,95
	Gos-glu	6,5	6,38	6,26	6,16	6,1

ES 2 612 142 T3

Inu	6,5	6,42	6,38	6,36	6,4
Lar	6,43	6,25	6,05	5,92	5,86

Tabla 5

		0	3	6	8	10
MB2509	Glu	6,53	6,41	6,35	6,31	6,33
	Fos	6,58	6,52	6,46	6,42	6,44
	Xos	6,56	6,51	6,48	6,45	6,5
	Gos-gal	6,56	6,52	6,49	6,47	6,52
	Gos-glu	6,57	6,5	6,47	6,43	6,45
	Inu	6,57	6,54	6,5	6,49	6,52
	Lar	6,53	6,48	6,45	6,43	6,46
		0	3	6	8	10

Tabla 6

		0	3	6	8	10
MB109	Glu	6,47	6,39	6,32	6,18	5,69
	Fos	6,5	6,44	6,38	6,25	5,76
	Xos	6,5	6,43	6,38	6,26	6,15
	Gos-gal	6,58	6,51	6,45	6,37	6,06
	Gos-glu	6,6	6,52	6,44	6,26	5,83
	Inu	6,6	6,54	6,47	6,34	5,93
	Lar	6,54	6,48	6,42	6,37	6,09

REIVINDICACIONES

1. Composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica que comprende una composición bacteriana que comprende

- al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum* seleccionada del grupo que consiste en la cepa bacteriana *B. bifidum* BB06 (MB107) DSM 24688 y la cepa bacteriana *B. bifidum* MB109 DSM 23731 capaz de adsorber colesterol sobre su pared celular de superficie; y

- al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium lactis* o *Bifidobacterium breve* seleccionada del grupo que consiste en la cepa bacteriana *B. lactis* MB2409 DSM 23733 y la cepa bacteriana *B. breve* (MB113) DSM 23732 capaz de hidrolizar sales biliares a nivel intracelular y/o extracelular, para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de la hipercolesterolemia.

2. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, para reducir el nivel de colesterol de LDL en la sangre.

3. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 1-2, en la que está presente adicionalmente una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* capaz de producir ácido linoleico conjugado (CLA) a partir de ácido linoleico (LA).

4. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en la que dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* es *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233.

5. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición bacteriana consiste en al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum*, al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium lactis* y al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum*,

en la que:

- dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum* se selecciona del grupo que consiste en la cepa bacteriana *B. bifidum* BB06 (MB107) DSM 24688 y la cepa bacteriana *B. bifidum* MB109 DSM 23731,

- dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium lactis* es la cepa bacteriana *B. lactis* MB2409 DSM 23733, y

- dicha cepa que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* es *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233,

para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de la hipercolesterolemia.

6. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 1-5, en la que dicha composición bacteriana consiste en la cepa bacteriana *B. bifidum* MB109 DSM 23731, la cepa bacteriana *B. lactis* MB2409 DSM 23733 y la cepa *Bifidobacterium longum* BL04 DSM 23233.

7. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 1-6, en la que está presente adicionalmente al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende esteroides o fitoesteroides, estanoles o fitoesteroides, glucomanano, goma konjac y/o al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende fructo-oligosacáridos-FOS, galacto-oligosacáridos-GOS, xilo-oligosacáridos-XOS, inulina, fibra de alerce o arabinogalactano y/o arroz rojo fermentado y/o betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y/o gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada.

8. La composición alimenticia o producto complementario o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en el que está presente adicionalmente:

(i) al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende esteroides o fitoesteroides y/o estanoles o fitoesteroides y al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende glucomanano, goma konjac, arroz rojo fermentado, betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada;

- 5 (ii) al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende esteroides o fitoesteroides y/o estanoles o fitoestanoles y al menos una sustancia vegetal seleccionada del grupo que comprende glucomanano, goma konjac, arroz rojo fermentado, betaglucanos de avena, salvado de avena, cebada, salvado de cebada y gel de *Aloe arborescens* en forma liofilizada y al menos una fibra prebiótica seleccionada del grupo que comprende FOS, GOS, XOS, inulina, fibra de alerce o arabinogalactano.

Figura 1

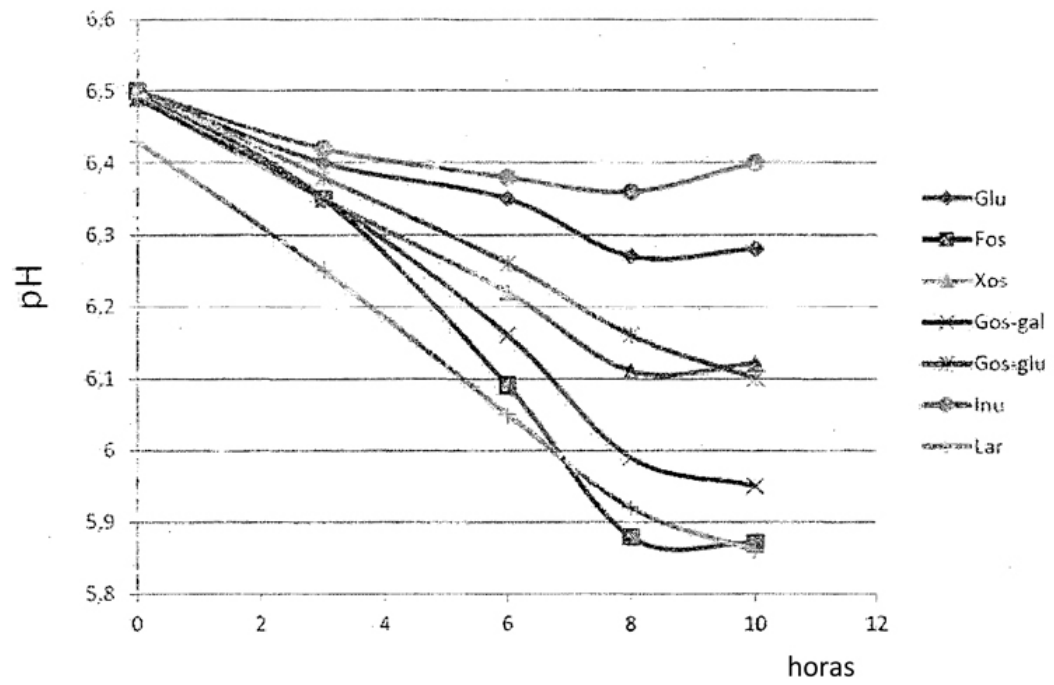


Figura 2

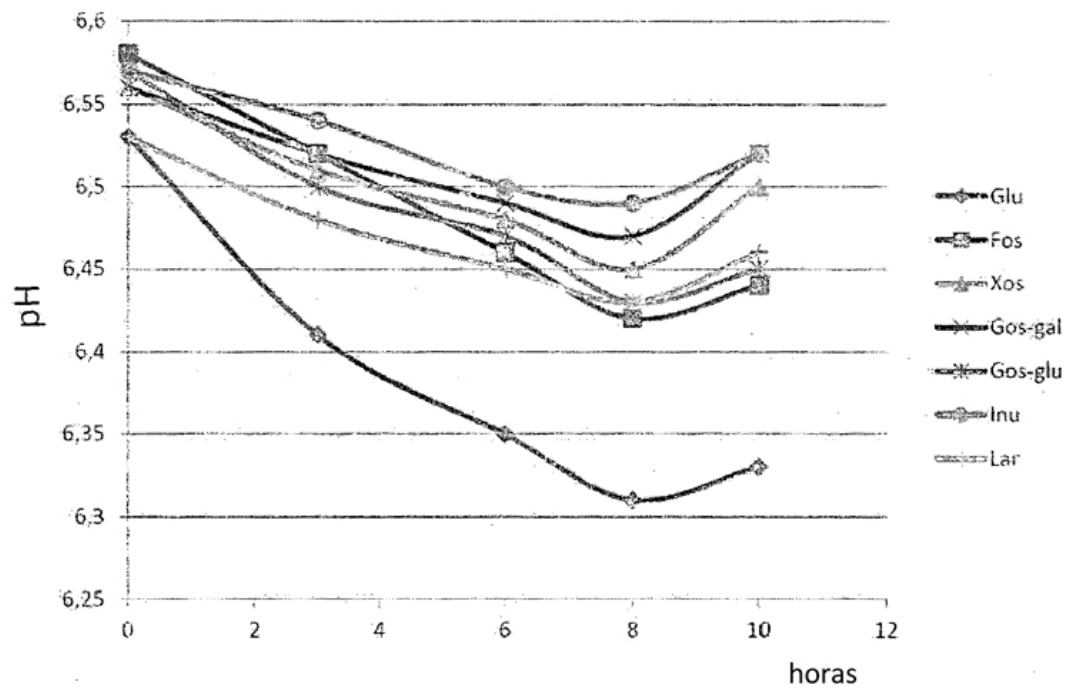


Figura 3

