

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 552**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23L 33/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2003 PCT/NL2003/000884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2004 WO04052380**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2003 E 03782976 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 1569667**

54 Título: **Preparación reductora del colesterol, suplemento alimenticio y producto alimenticio, y métodos para su preparación**

30 Prioridad:

**12.12.2002 NL 1022153**

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

**22.08.2017**

73 Titular/es:

**EZCOL B.V. (100.0%)  
Lunerkampweg 5  
5245 NB Rosmalen, NL**

72 Inventor/es:

**EMEIS, JOSEPHUS JAN y  
LASSEUR, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 630 552 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**

Preparación reductora del colesterol, suplemento alimenticio y producto alimenticio, y métodos para su preparación

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a preparaciones reductoras del colesterol, en particular a una preparación bacteriana para uso como un medicamento para la reducción de los niveles de colesterol en el plasma sanguíneo.

10

La invención se refiere además a un producto farmacéutico, un suplemento alimenticio que contiene esta preparación, un alimento que contiene este suplemento alimenticio, y a métodos para su preparación.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

[0002] La enfermedad cardiovascular es provocada por un número de factores sinérgicos, el más importante siendo un nivel de colesterol en sangre demasiado alto.

El colesterol es un bloque de construcción esencial para las células animales y humanas, al ser un componente de las membranas celulares.

20

Las células humanas pueden sintetizar su propio colesterol, pero el colesterol es también asimilado de los alimentos.

Ambos procesos juegan una parte importante en el metabolismo del colesterol.

[0003] Aparte de su papel biológico esencial como un bloque de construcción para membranas celulares, el colesterol también tiene efectos negativos en la salud humana, como causa de enfermedad cardiovascular (tal como, por ejemplo, infarto de miocardio, derrame cerebral, y enfermedad vascular periférica), más específicamente en relación a la ocurrencia de lesiones ateroscleróticas en la pared del vaso sanguíneo.

25

Un nivel de colesterol en el plasma elevado es el factor de riesgo predictivo más importante para la incidencia de enfermedad cardiovascular y aterosclerosis.

30

[0004] En el plasma sanguíneo, el colesterol se transporta en las denominadas lipoproteínas, que se pueden subdividir en un número de diferentes clases, con base en su diámetro y densidad específica.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) constituyen las clases más importantes de lipoproteínas.

35

[0005] Estudios experimentales y clínicos han mostrado que la cantidad de colesterol transportada en las clases de lipoproteínas VLDL, IDL y LDL (el denominado colesterol proaterogénico) es un factor de riesgo para la incidencia de enfermedad cardiovascular.

40

El colesterol transportado en partículas HDL, en cambio, protege contra el desarrollo de enfermedad cardiovascular (colesterol antiaterogénico).

[0006] Estudios clínicos prospectivos aleatorizados controlados por placebo han demostrado que la reducción del colesterol en el plasma tiene un efecto favorable en la incidencia de enfermedad cardiovascular y en la mortalidad.

45

Un prerrequisito es, sin embargo, que la reducción en el colesterol debería ser debida a una reducción en el colesterol proaterogénico presente en VLDL, IDL y LDL.

[0007] Para el tratamiento y prevención de enfermedad cardiovascular es por lo tanto imperativo reducir el colesterol proaterogénico, y aumentar, en la proporción absoluta o relativa, el colesterol antiaterogénico.

50

Un número de métodos están disponibles para reducir el colesterol en el plasma.

Los más importantes son:

- inhibir la biosíntesis del colesterol;
- aumentar la eliminación del colesterol (y/o sus metabolitos, específicamente ácidos biliares) de tejidos en el lumen intestinal;
- reducir la absorción de colesterol y ácidos biliares desde el tracto gastrointestinal.

55

[0008] Fármacos que son hoy en día usados para inhibir la síntesis de colesterol son frecuentemente inhibidores de la enzima hidroximetil-glutaril-coenzima A reductasa (HMGCoA reductasa), la enzima reguladora en la vía sintética para colesterol.

60

Estas denominadas "estatinas" son moléculas que inhiben competitivamente la acción enzimática.

Ejemplos son simvastatina ("Zocor®"), pravastatina ("Pravachol®") y atorvastatina ("Lipitor®").

Las estatinas son generalmente derivados sintetizados químicamente de metabolitos fúngicos naturales.

65

[0009] Para aumentar la eliminación de colesterol una resina de adsorción de ácido biliar se puede usar (por ejemplo, colestiramina, "Questran®").

Debido a la adsorción de ácidos biliares a la resina, su secreción en la deposición es aumentada, y su reabsorción desde el intestino en la sangre es reducida, dando como resultado una pérdida relativa de ácidos biliares del cuerpo.

5 En consecuencia, el hígado aumenta la conversión de colesterol en ácidos biliares, dando como resultado un aumento neto en la secreción de colesterol(metabolitos) desde el cuerpo.

Como los ácidos biliares (por solubilización del colesterol) son esenciales para la absorción de colesterol desde el lumen en el tejido intestinal, una reducción en el contenido de ácido biliar en el lumen intestinal también resultará en una absorción de colesterol disminuida.

10 [0010] Fármacos que inhiben el transporte activo de colesterol desde el lumen intestinal a la sangre por inhibición de los sistemas de transporte celulares para colesterol (y relativos esteroides) en las células epiteliales intestinales están todavía bajo desarrollo.

Un tal compuesto ("Ezetimibe®") ha sido registrado recientemente en algunos países; otros fármacos relativos están siendo todavía evaluados en pruebas clínicas.

15 [0011] Además del uso de fármacos, los objetivos anteriormente mencionados también pueden ser alcanzados por el uso de compuestos naturales, o de compuestos derivados de productos naturales (Hassel, 1998).

Un compuesto tipo estatina ocurre de forma espontánea en el denominado "arroz rojo", una cepa de arroz que lleva un moho que produce lovastatina.

20 Este metabolito fúngico es idéntico al medicamento reductor de colesterol "Mevacor®".

Otro ejemplo es la incidencia, en plantas, de los denominados fitosteroides, que competitivamente inhiben la absorción intestinal de colesterol y ácidos biliares.

25 Fitosteroides son usados hoy en día como aditivos reductores de colesterol en las margarinas "Benecol®" y "Becel Pro-actif®".

[0012] El documento de patente china CN 1 274 584 divulga una preparación de *Rhodospirillum* para reducir el lípido de la sangre y un método para la producción de dicha preparación.

30 [0013] El documento de patente china CN 1 172 653 divulga una preparación líquida de *Rhodospirillum* para usar en la terapia y un método de obtención de dicha preparación.

[0014] El documento de Patente japonesa JP 08 205819 divulga un suplemento alimenticio o probiótico (bebida saludable) que contiene *Rhodospirillum*.

35 [0015] Ninguno de estos documentos, sin embargo, proporciona información que una parte específica de la célula sería responsable de la actividad farmacéutica asegurada.

40 [0016] Böhm et al. (J. Bacteriol. 6179-6183,1992) divulga una suspensión comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* en Tris-HCl (pH 7,8) y 2mM tionito de sodio.

[0017] Sin embargo, allí todavía existe una necesidad para la reducción de colesterol de preparaciones, específicamente para usar en la industria alimentaria, y preferiblemente dirigida a la nutrición humana.

#### 45 RESUMEN DE LA INVENCION

[0018] En un primer aspecto la invención ahora proporciona una preparación que comprende la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. para uso como un medicamento. Preferiblemente dicho uso es para reducir el colesterol en el plasma.

50 [0019] En todavía otro aspecto la presente invención se refiere al uso de una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. para la producción de un medicamento para reducir el colesterol en el plasma.

55 [0020] La presente invención proporciona en otro aspecto un suplemento alimenticio con las propiedades de reducir el colesterol, que comprende una preparación que comprende la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp.

60 [0021] En otro aspecto la invención proporciona un alimento que comprende un suplemento alimenticio según la invención.

[0022] En otro aspecto la invención proporciona un método para la producción de una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp., que comprende cultivar una o más células de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. a un cultivo multicelular, someter a ultrasonidos dichas células, separando el material membranoso del material citoplasmático, seguido de otro lavado y paso de recentrifugación.

65

[0023] En otro aspecto la invención proporciona un método para la producción de un suplemento alimenticio según la invención, que comprende la fabricación adecuada para consumo de una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. destinada para uso como un medicamento según la presente invención.

[0024] En otro aspecto la invención proporciona un método para la producción de un producto alimenticio según la invención, que comprende incorporar un suplemento alimenticio según la invención en un alimento.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0025]

La Figura 1 muestra el efecto en el colesterol y triglicéridos en el plasma en ratas Wistar alimentadas con una comida normal, o una comida que contiene 10% (p/p) de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 2. \* significa  $p < 0,001$  con respecto a controles.

La Figura 2 muestra el modelo lipoproteínico en el plasma de ratas Wistar alimentadas con una dieta de comida normal, y de ratas Wistar alimentadas con una dieta de comida conteniendo 10% (p/p) de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 2. (separación por cromatografía líquida de proteína rápida).

La Figura 3 muestra el efecto en el colesterol y triglicéridos en el plasma en ratones C57B1/6 alimentados una dieta de comida normal, y una dieta de comida conteniendo 10% (p/p) de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 3. \* significa  $p < 0,003$  con respecto a controles.

La Figura 4 muestra el efecto en el colesterol y triglicéridos en el plasma en ratones C57B1/6 alimentados con una dieta hipercolesterolémica "tipo occidental", y una dieta hipercolesterolémica "tipo occidental" conteniendo 10% (p/p) de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 4. \* significa  $p < 0,0003$  con respecto a controles. \*\* significa  $p < 0,011$  con respecto a controles.

La Figura 5 muestra el modelo lipoproteínico en el plasma de ratones C57B1/6 alimentados con una dieta hipercolesterolémica "tipo occidental", y una dieta hipercolesterolémica "tipo occidental" conteniendo 10% (p/p) de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 4. (separación por cromatografía líquida de proteína rápida).

La Figura 6 muestra el efecto de diferentes concentraciones de *R. rubrum* en una dieta "tipo occidental" en el colesterol en el plasma después de una y dos semanas, como se explica en el ejemplo 5. \* significa significativamente diferente de controles después de dos semanas ( $p < 0,001$  con respecto a controles). \*\* significa significativamente diferente de 0% de *R. rubrum* después de una semana ( $p < 0,001$  con respecto a controles) (los datos mostrados son medias  $\pm$  s.d.).

La Figura 7 muestra el modelo lipoproteínico de ratones APOE3\*Leiden alimentados con una dieta hipercolesterolémica "tipo occidental", y conteniendo concentraciones diferentes de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 5 (separación por cromatografía líquida de proteína rápida).

La Figura 8 muestra el efecto de diferentes concentraciones de *R. rubrum* en una dieta "tipo occidental" en el colesterol y latosterol en el plasma después de dos semanas, como se explica en el ejemplo 5. \* significa significativamente diferente de controles (datos mostrados son media  $\pm$  s.d.).

La Figura 9 muestra el efecto de diferentes concentraciones de *R. rubrum* en una dieta "tipo occidental" en el colesterol en el plasma y  $\beta$ -sitosterol después de dos semanas, como se explica en el ejemplo 5 (datos mostrados son media  $\pm$  s.d.).

La Figura 10 muestra la síntesis de VLDL-triglicéridos (marco a) y la composición lipídica de VLDL (marco b) en ratones alimentados con una dieta "tipo occidental" que contiene concentraciones diferentes de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 5.

La Figura 11 muestra la excreción de esteroides neutros en heces de ratones alimentados con una dieta "tipo occidental" que contiene concentraciones diferentes de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 5.

La Figura 12 muestra la excreción de ácidos biliares en heces de ratones alimentados con una dieta "tipo occidental" que contiene concentraciones diferentes de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 5.

La Figura 13 muestra la excreción de esteroides neutros más ácidos biliares en heces de ratones alimentados con una dieta "tipo occidental" que contiene concentraciones diferentes de *R. rubrum*, como se explica en el ejemplo 5.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0026] *Rhodospirillum* es un género en la familia *Rhodospirillaceae*, una familia de bacterias moradas sin azufre del orden *Rhodospirillales* y la clase Alpha-proteobacteria. *Rhodospirillaceae* son, entre otras características, caracterizadas por ser fototróficas, y por crecer tanto aeróbicamente como anaeróbicamente, usando la luz como una fuente de energía.

Para este fin, las bacterias contienen clorofila B. En el género *Rhodospirillum*, se distinguen tres especies, por ejemplo *Rhodospirillum rubrum* (Imhoff y Trüper, 1992), *Rhodospirillum centenum* y *Rhodospirillum photometricum*. Además, cuatro especies no son oficialmente reconocidas, vz. *Rhodospirillum salexigens*, *Rhodospirillum salinarum*, *Rhodospirillum sodomense*, y *Rhodospirillum tenue*. En el género *Phaeospirillum*, otro miembro de la familia *Rhodospirillaceae*, dos especies están incluidas: *Phaeospirillum fulvum* y *Phaeospirillum molischianum*. (Para nomenclatura véase Imhoff et al(1998); Euzéby (2003); y referencia 1).

[0027] *Rhodospirillum rubrum* se encuentra, entre otros, en aguas naturales, en el barro, y en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

La bacteria se usa en la purificación de aguas residuales, para producción de biomasa de alimento para animales (por ejemplo, como pienso para aves y pescado), y como un fertilizante.

Biomasa de bacterias fototróficas se considera una materia prima excelente para pienso para animales debido a su alto contenido de vitaminas y aminoácidos.

[0028] El uso de *Rhodospirillum rubrum* como pienso para animales ha sido practicado durante algún tiempo (Imhoff y Trüper, 1992).

Los presentes inventores, sin embargo, sorprendentemente descubrieron que *R. rubrum* puede contribuir de manera importante a la prevención de enfermedad cardiovascular por la reducción del nivel de colesterol en el plasma sanguíneo y/o suero sanguíneo (sangre).

[0029] Una propiedad de reducción del colesterol se define aquí como la capacidad de una composición, una preparación, un suplemento alimenticio o un producto alimenticio, cuando se administra al cuerpo de un sujeto en la manera apropiada, para bajar el nivel de colesterol en la sangre de dicho sujeto.

Métodos para medir el nivel de colesterol en sangre son conocidos por la persona experta.

[0030] Una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.* es aquí definida como una cantidad de material de fracción de membrana de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.* que ha sido procesada de alguna forma.

[0031] Una preparación según la invención puede muy bien consistir en una especie del género *Rhodospirillum*, pero mezclas de diferentes *Rhodospirillum spp.* tales como *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum centenum*, *Rhodospirillum tenue*, *Rhodospirillum photometricum*, *Rhodospirillum salexigens*, *Rhodospirillum salinarum*, y/o *Rhodospirillum sodomense*, o mezclas de *Phaeospirillum spp.*, tales como *Phaeospirillum fulvum* y *Phaeospirillum molischianum* pueden también usarse.

Combinaciones de *Rhodospirillum spp.* y *Phaeospirillum spp.* están también comprendidas en la presente invención.

[0032] Preferiblemente, una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.* comprende *Rhodospirillum rubrum* y/o *Phaeospirillum molischianum*, todavía más preferiblemente la especie de tipo cepa ATCC 11170 de *Rhodospirillum rubrum* (cepa DSM 467) o cepa ATCC 25903 y/o cepa DSM 120 de *Phaeospirillum molischianum*. (ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

[0033] Una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.*, en formas de realización de la presente invención, puede bien contener 20-100% (p/p), preferiblemente 40-100% (p/p), aún más preferiblemente 60-100% (p/p), y óptimamente 80-100% (p/p) de material celular de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.*

Además, una preparación puede contener otros componentes, dependiendo del modo en que la preparación seleccionada debe ser preparada.

Por ejemplo, una preparación puede todavía contener agua, o, en el caso de una preparación liofilizada, glicerol o sacarosa.

[0034] En una forma de realización preferida, una preparación liofilizada comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.* se mezcla con materiales de relleno tales como celulosa microcristalina (MCC) o manitol, con un ligante tal como hidroxipropilcelulosa (HPC), y/o lubricantes, tales como ácido esteárico y/o otros excipientes, y granulada como un polvo seco, o preparada para la aplicación en una forma diferente.

[0035] Tal preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.* es muy adecuada para el uso como un medicamento o producto farmacéutico para bajar los niveles de colesterol en el plasma, preferiblemente en el plasma humano.

La preparación también puede contener células vivas de *Rhodospirillum spp.* y/o *Phaeospirillum spp.*, o células muertas, o restos celulares, etc.

[0036] Formas de realización alternativas de una preparación según la presente invención son posibles igualmente.

Por ejemplo, una preparación se puede suministrar como una preparación fluida que contiene componentes sólidos suspendidos, dispersados o emulsionados en un fluido acuoso.

Tal composición se puede usar directamente como una preparación según la invención, o ser procesada en un suplemento alimenticio en una forma de realización alternativa.

- [0037] En la presente invención un suplemento alimenticio se define como una formulación que se puede consumir además de una dieta normal y que contiene componentes que no ocurren en una dieta normal, o que ocurren en cantidades bajas o en cantidades insuficientes, mientras consumo suficiente o aumentado de estos componentes es deseado.
- 5 Preferiblemente, un suplemento alimenticio está compuesto de manera que es adecuado para consumo humano.
- En consecuencia, un suplemento alimenticio tal y como se define en la presente invención debería preferiblemente tener una textura, sabor y olor, pero también un valor nutricional, haciendo que el suplemento sea adecuado para consumo humano.
- 10 [0038] En formas de realización de la presente invención un suplemento alimenticio con propiedades reductoras del colesterol comprende una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp.
- 15 [0039] Un suplemento alimenticio según la invención puede adecuadamente contener de 0,1 a 99,9 % (p/p) de una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. Preferiblemente, un suplemento alimenticio contiene 10% a 90% (p/p), aún más preferiblemente 30 a 75% (p/p), de una preparación de *Rhodospirillum* spp y/o *Phaeospirillum* spp.
- 20 [0040] Para hacer un suplemento alimenticio que comprende una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. adecuada para el consumo, los componentes se pueden adicionar para mejorar, por ejemplo, la textura, sabor u olor.
- En consecuencia, un suplemento alimenticio según la invención puede comprender fuentes (adicionales) de proteína, carbohidrato y grasa, y vitaminas, minerales, electrolitos, oligoelementos, y otros componentes
- 25 adecuados, de modo que el suplemento alimenticio puede usarse él mismo como un alimento nutritivo.
- [0041] Como una fuente de proteína todas y cada una de las proteínas que son adecuadas para usar en formulaciones nutricionales, y mezclas de éstas, se pueden usar en un suplemento alimenticio según la invención.
- 30 Este tipo de proteínas abarca por ejemplo proteínas animales tales como proteínas de suero de leche, concentrados de proteína de suero de leche, polvo de suero de leche, proteína de huevo, albúmina de huevo, caseína, o albúmina de leche, y proteínas vegetales tales como proteína de soja, harina de soja, o proteínas de leche de soja.
- Para la elección de la fuente de proteínas para ser usada, el valor biológico de una proteína puede constituir
- 35 un criterio importante.
- Caseinato, incluyendo caseinato de calcio, pero también suero de leche, albúmina de leche, albúmina de huevo, y proteínas de huevo totales, por ejemplo, son proteínas con un valor biológico muy alto, porque contienen una proporción grande de aminoácidos esenciales.
- 40 [0042] Carbohidratos adecuados para ser usados en un suplemento alimenticio según la invención pueden, por ejemplo, ser simples carbohidratos de cadena corta tal como mono- y disacáridos, pero también polisacáridos, o una combinación de ambos.
- Un carbohidrato se puede seleccionar debido a sus propiedades organolépticas adecuadas.
- 45 Un carbohidrato complejo puede adecuadamente usarse como una fibra alimentaria.
- [0043] Un suplemento alimenticio según la invención puede contener, en algunas formas de realización combinaciones de ambos carbohidratos simples y complejos.
- Como grasa todos los aceites y grasas comestibles pueden usarse.
- 50 [0044] Vitaminas y minerales pueden ser adicionados, en conformidad con las normas de las autoridades reguladoras de la salud, y abarcar todas las vitaminas y minerales avaladas por las autoridades anteriores, por ejemplo vitamina A, B1, B2, B12, C, D, E, y K, y ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, y biotina.
- Como minerales por ejemplo hierro, zinc, yodo, calcio, magnesio, cromo, y selenio pueden ser adicionados.
- 55 [0045] Electrolitos tales como sodio, potasio, y cloruro, y oligoelementos y otros aditivos también pueden formar parte de un suplemento alimenticio según la invención.
- Tales componentes son, en caso de estar presentes, preferiblemente usados en las concentraciones recomendadas.
- Adicionalmente, un suplemento alimenticio según la invención puede contener componentes que mejoran su
- 60 textura, colorantes y aromatizantes, sustancias aromáticas, especias, productos de relleno, emulgentes, compuestos estabilizantes, conservantes, antioxidantes, fibras, y otros suplementos tales como aminoácidos, colina, lecitina, ácidos grasos, etc. La elección de tales componentes dependerá de formulación, diseño, y preferencias.
- Las cantidades de tales componentes que se pueden adicionar se conocen por la persona experta, mientras
- 65 la elección de las cantidades que deben ser adicionadas se pueden guiar considerando las cantidades diarias recomendadas (RDA) para niños y adultos.

- [0046] Emulsionantes se pueden adicionar para estabilizar el producto final.  
Ejemplos de emulsionantes aceptables son lecitina (por ejemplo, soja o huevo), y/o mono- y diglicéridos.  
Como estabilizadores algarrobo, guar o carragenina pueden, por ejemplo, usarse.
- 5 [0047] Conservantes se pueden adicionar para aumentar el tiempo de conservación del producto.  
Preferiblemente, conservantes tales como sorbato de sodio, sorbato de potasio, benzoato de potasio, benzoato sódico, o EDTA disódico cálcico son usados.
- 10 [0048] Además de los carbohidratos, edulcorantes mencionados arriba naturales o sintéticos, tales como sacáridos, ciclamatos, aspartamina, acesulfamo de potasio, y/o sorbitol, se pueden adicionar al suplemento alimenticio.
- 15 [0049] Las cantidades de suplemento alimenticio para consumir pueden variar en tamaño, y no están necesariamente restringidas a las dosificaciones mencionadas en las dosificaciones aconsejadas.  
El término "suplemento alimenticio" no significa restringirse a un peso específico, o a una dosis específica del suplemento alimenticio.
- 20 [0050] La composición de un suplemento alimenticio según la invención puede en principio coger cualquier forma que se adecua para consumo humano o animal.  
En una forma de realización preferida, el suplemento es un polvo seco que se adecua para ser suspendido, dispersado o emulsionado en un fluido acuoso tal como café, té, caldo, o zumo de frutas.  
Para ese fin, el polvo se puede suministrar en un dispensador.
- 25 [0051] En una forma de realización preferida alternativa, el suplemento es formulado, partiendo de polvo seco, como una pastilla.  
Con este fin, la composición de un suplemento alimenticio según la invención puede idóneamente ser suministrada con productos de relleno tales como celulosa microcristalina (MCC) y manitol, ligantes tales como hidroxipropilcelulosa (HPC), lubricantes tales como ácido esteárico, y otros excipientes.
- 30 [0052] Un suplemento alimenticio según la invención también se puede suministrar como un fluido, donde los componentes sólidos han sido suspendidos, dispersados o emulsionados.  
Tal composición puede ser directamente mezclada en un alimento, o puede por ejemplo ser extruida y formateada en gránulos u otras formas.
- 35 [0053] En una forma de realización alternativa, un suplemento alimenticio se puede formular en una forma sólida, tal como una barra, una galleta, o un rollo.
- 40 [0054] Un suplemento alimenticio es preferiblemente formulado para consumo oral, posiblemente en combinación con un portador aceptable tal como una cápsula, una pastilla, un polvo miscible en agua, u otra forma aceptable para administración, pero también se puede procesar en un alimento.
- 45 [0055] Otros aspectos de la presente invención conciernen vías de producción de una preparación, un suplemento alimenticio, o un alimento según la invención.
- 50 [0056] Un método para la producción de una preparación según la invención puede bien implicar los pasos necesarios para el cultivo de células de una o más *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp., para cosechar dicho cultivo, y para procesar las células de dicho cultivo en una preparación comprendiendo la fracción de membrana.
- [0057] Detalles de tales métodos son, entre otros, descritos en los ejemplos mencionados más abajo.  
La persona experta entenderá que varios métodos alternativos pueden ser usados.
- 55 [0058] Durante el cultivo de células de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. condiciones anaeróbicas y fototróficas son aplicadas.  
Como una fuente de carbono, varios nutrientes orgánicos pueden ser usados.  
Medios de cultivo muy adecuados y condiciones de crecimiento para células de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. son por ejemplo "medio de Segers y Verstraete" (Segers y Verstraete, 1983), usando ácido láctico (aproximadamente 2,7 gramo/l) como una fuente de carbono, a un pH de aproximadamente 6.8-6.9, y a una temperatura de 25-37°C, preferiblemente adaptado a los requisitos específicos del microorganismo implicado, a intensidad de luz constante de por ejemplo iluminación en banda (intensidad de luz 300  $\mu\text{M}$  quanta. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y anaeróbicamente.  
Otros medios adecuados para cultivar *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. son por ejemplo "medio modificado de *Rhodospirillaceae*" (medio DSMZ #27, DMSZ GmbH, Braunschweig, Alemania), o medio Cens (medio DSMZ # 748).
- 65

Las células son adecuadas para ser cultivadas a una densidad de 0,01 - 50 mg/mL, preferiblemente 1-5 mg de peso en húmedo / mL.

5 [0059] Las células pueden igualmente ser crecidas anaeróbicamente a 30 °C en matraces de 1 litro con un medio constituido de 3,1 ml/l 60% solución de DL-lactato, 3 g/l peptona bacteriológica y 3 g/l extracto de levadura en agua corriente, el pH del medio siendo 6.8, e iluminado con una fuerza de radiación de fotón medio de 50  $\mu\text{M quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , usando 3 lámparas de tungsteno de 40W. Después de 3 días de crecimiento, la densidad óptica a 660 nm resultó 3.5 (1.2 g/kg peso seco).

10 [0060] Una vez que las células han alcanzado una densidad de célula adecuada, se pueden procesar en una preparación según la invención usando separación del medio de crecimiento o cosecha por, por ejemplo, centrifugación o filtración.

15 [0061] Otros pasos en el procesamiento de material celular de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. para obtener una preparación utilizable podría implicar, por ejemplo, un paso de lavado, pero puede también implicar otro procesamiento de las células por extracción, o liofilización.

20 [0062] Una etapa posterior en el procesamiento de material de célula de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. para obtener una preparación utilizable implica la aplicación de ultrasonidos a células, seguido de la separación de material membranoso del material citoplasmático por centrifugación, seguido de otro paso de lavado y recentrifugación.

Un suplemento alimenticio según la invención puede adecuadamente usarse para reducir la absorción de colesterol intestinal, así reduciendo el nivel de colesterol del plasma sanguíneo.

25 [0063] Otra forma de realización de la invención implica la incorporación de un suplemento alimenticio en un alimento con propiedades reductoras del colesterol.

[0064] Un método para preparar un alimento reductor del colesterol implica la producción de un alimento que incorpora un suplemento alimenticio.

30 Tal método puede implicar un paso en el que un alimento es antes preparado según la vía normal, seguido de la adición de una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. al alimento preparado.

También, es posible añadir una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. al alimento durante su producción.

35 [0065] Un alimento con propiedades reductoras del colesterol según la invención contiene de forma característica 0,1 a 20% (p/p), preferiblemente 1 a 10% (p/p), del suplemento alimenticio anteriormente descrito.

40 [0066] La presente invención implica finalmente una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. para usarse en un medicamento para bajar el nivel de colesterol del plasma sanguíneo.

Preferiblemente, tal preparación debería implicar las especies *Rhodospirillum rubrum* y/o *Phaeospirillum molischianum*.

45 [0067] La invención ahora será ilustrada por los ejemplos siguientes.

#### EJEMPLOS

##### 50 Ejemplo 1. Producción de *Rhodospirillum rubrum*.

(Ejemplo de referencia)

55 [0068] Cepa ATCC 25903 de *R. rubrum* fue usada para la producción de la biomasa usada en los experimentos.

Células liofilizadas fueron rehidratadas en el medio R8AH (medio 550 de ATCC), y cultivadas en "medio Segers y Verstraete" (ver arriba), usando ácido láctico (2.7 g/L) como una fuente de carbono, a pH 6.9  $\pm$  0.1.

60 El cultivo final de la biomasa usada en los experimentos se produjo en biorreactores de 20 litros, en el mismo medio de cultivo, a 30  $\pm$  1 °C, pH 6.8  $\pm$  0.1, y a intensidad de luz constante (luz de banda; 300  $\mu\text{M quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), bajo condiciones anaeróbicas.

Después de cinco días de cultivo, la biomasa (3.4 gramos de peso mojado/L) fue cosechada por centrifugación continua, almacenada a -40°C, y liofilizada.

##### 65 Ejemplo 2. Otra vía de producción de *Rhodospirillum rubrum*.

(Ejemplo de referencia)



[0069] A examinar el efecto de condiciones de cultivo en la eficacia de la reducción del nivel de colesterol, *R. rubrum* ATCC 25903 fue crecido también anaeróticamente a 30°C en matraces de 1 litro con un medio constituido de 3.1 ml/l de solución de DL-lactato al 60%, 3 g/l peptona bacteriológica y 3 g/l extracto de levadura en agua corriente.

El pH del medio fue 6.8.

El matraz fue incubado en un incubador (New Brunswick Scientific, modelo G 25) en un agitador magnético (Variomag multipoint HP15). Los matraces fueron iluminados con una fuerza de radiación de fotón medio de  $50 \mu\text{M quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , usando 3 lámparas de tungsteno de 40W.

Después de 3 días de crecimiento, la densidad óptica a 660 nm resultó 3.5 (1.2 g/kg peso en seco) y las células fueron cosechadas por centrifugación a 6500 g, lavadas con agua desmineralizada y liofilizadas (VirTis freezemobile 24). *R. rubrum* cultivado de esta manera produjo el mismo efecto en los niveles de colesterol de plasma como lo hicieron las células de *R. rubrum* cultivadas como se describe en el ejemplo 1, que fueron usadas en más ejemplos.

Ejemplo 3. Aplicabilidad de otra cepa de *Rhodospirillum rubrum*. (Ejemplo de Referencia)

[0070] Otra cepa de *R. rubrum*, DSM 467, fue crecida anaeróticamente a 25 °C de la misma manera en el mismo medio que se describe para el Ejemplo 2.

Las células fueron cosechadas después de 3 días de crecimiento a una densidad óptica a 660 nm de 4.5 (peso en seco 1,4 g/kg) y secadas como se describe para el Ejemplo 2.

La cepa DSM 467 produjo el mismo efecto en los niveles de colesterol en el plasma que la cepa 25903 de ATCC, que fue usada en la mayoría de ejemplos.

Ejemplo 4. Aplicabilidad de las especies *Phaeospirillum molischianum*.

(Ejemplo de referencia)

[0071] Otra bacteria fotosintética, DSM 120 de *Phaeospirillum molischianum*, fue crecida en matraces de 1 litro con medio de ATCC 550 a 25 °C bajo condiciones anaeróbicas como se describe para el Ejemplo 2.

Células fueron cosechadas después de 3 días de crecimiento a una densidad óptica a 660 nm de 4.0 (peso en seco 1.2 g/kg) y secadas como se describe para el Ejemplo 2.

Ejemplo 5. Efecto de *R. rubrum* en ratas alimentadas con comida.

(Ejemplo de referencia)

[0072] Ratas Wistar machos fueron alimentadas con una comida semi-sintética de ratas, reuniendo requisitos nutricionales (como se define en referencia 9) (Hope Farms, Woerden, Países Bajos).

A un grupo de ocho ratas se les dio esta comida básica.

A un segundo grupo de ocho ratas se les dio la misma comida, pero ahora conteniendo además 10% (p/p) de *R. rubrum* liofilizado (en intercambio para sacarosa).

Ambos grupos consumieron aproximadamente la misma cantidad de alimento ( $31 \pm 7$  gramo/día), y mostraron el mismo aumento en el peso corporal a lo largo del tiempo.

Después de ocho semanas, todos los parámetros clínicos químicos medidos (glucosa en sangre, ácido úrico, urea, creatinina, GOT, GPT, hematocrito, y hemoglobina, y glucosa miccional y proteína) fueron similares en ambos grupos, excepto el colesterol en el plasma y los triglicéridos en el plasma.

El colesterol en el plasma fue inferior significativamente en el grupo alimentado con la dieta que contenía *R. rubrum* ( $1.2 \pm 0.1$  mmol/L vs.  $1.6 \pm 0.1$  mmol/L; prueba T,  $p < 0.0001$ ), igual que lo fueron los triglicéridos en el plasma ( $0.5 \pm 0.1$  mmol/L vs.  $1.4 \pm 0.6$  mmol/L;  $p < 0.001$ ) (figura 1).

[0073] La separación de las lipoproteínas de plasma por cromatografía líquida de proteína rápida (fplc, sistema ÁKTA de Pharmacia-Amersham) mostró que la reducción en el colesterol y triglicéridos fue debida a una reducción de la fracción de LDL en el plasma, mientras que la fracción de HDL se mantuvo invariada en los animales alimentados con *R. rubrum* (figura 2).

La reducción inducida por *R. rubrum* en el colesterol en el plasma fue así específicamente debida a una reducción en el colesterol LDL.

Métodos usados para medir colesterol y triglicéridos, y para la separación de lipoproteínas por fplc se han descrito por van Vlijmen et al (1996) y Post et al (2000).

Ejemplo 6. Efecto de *R. rubrum* en los ratones alimentados con comida.

(Ejemplo de referencia)

[0074] Diez ratones C57Black/6 fueron alimentados con una comida de ratones semisintética normal durante siete días.

A cinco ratones se les dio posteriormente la misma comida durante otros siete días, mientras que a los cinco ratones restantes se les dio durante siete días la misma comida de ratón, pero ahora conteniendo 10% (p/p) de *R. rubrum*. La ingesta de comida no fue significativamente diferente entre grupos, y se calculó según el promedio 2.6 - 2.8 gramo/ratón.día.

5 Después de siete días, el nivel de colesterol en el plasma fue  $1.52 \pm 0.07$  mmol/L en los ratones alimentados con *R. rubrum*, significativamente inferior al nivel de colesterol en el plasma en el grupo de control ( $1.86 \pm 0.15$  mmol/L; prueba T,  $p=0.003$ ) (figura 3).  
Niveles de triglicéridos en el plasma fueron invariados.

10 Ejemplo 7. Efecto de *R. rubrum* en ratones alimentados con una dieta "tipo occidental".

(Ejemplo de referencia)

15 [0075] Diez ratones C57Black/6 fueron alimentados durante tres semanas con una dieta semisintética, la dieta denominada "tipo occidental", una dieta conteniendo 15% (p/p) de grasa, y 0,25% (p/p) de colesterol (Nishina et al, 1990).

Posteriormente, cinco ratones fueron alimentados con la misma dieta durante siete días, mientras otros cinco ratones fueron alimentados con la misma dieta pero conteniendo además 10% (p/p) de *R. rubrum* (algún colesterol fue también añadido a esta dieta para mantener su contenido de colesterol a 0.25%).

20 Después de estos siete días, el nivel de colesterol en el grupo de control fue  $3.07 \pm 0.18$  mmol/L, mientras en el grupo alimentado con la dieta que contenía *R. rubrum* el nivel de colesterol fue  $2.26 \pm 0.21$  mmol/L (prueba T,  $p = 0.0003$ ) (figura 4).

Los triglicéridos en el plasma no disminuyeron.

25 La separación de las lipoproteínas por fplc, mostró que el colesterol LDL prácticamente desapareció del plasma de ratones alimentados con la dieta tipo occidental que contenía *R. rubrum*, mientras el colesterol HDL no mostró ninguna diferencia intergrupo (Figura 5).

30 Ejemplo 8. Efecto de *R. rubrum* en ratones APOE\*3Leiden transgénicos alimentados con una dieta "tipo occidental".

(Ejemplo de referencia)

35 [0076] En este experimento, se usaron ratones en los que el gen humano para la denominada mutación de Leiden de la apolipoproteína E3 (APOE\*3Leiden) fue incorporada por transgénesis.

Debido a este cambio transgénico, estos denominados ratones APOE\*Leiden tienen un perfil lipoproteínico humanizado, y son extremadamente adecuados para el estudio del efecto de compuestos en el metabolismo lipoproteínico (van Vlijmen et al, 1996,1998).

40 [0077] El diseño del estudio fue de la siguiente manera: grupos de ratones fueron alimentados durante 5 semanas con dieta "tipo occidental" (ver arriba) conteniendo 0,25% (p/p) de colesterol. Esta dieta aumentó su nivel de colesterol en el plasma a 13-14 mmol/L.

Posteriormente, los ratones fueron aleatorizados, basándose en su nivel de colesterol en el plasma, en grupos de seis ratones cada uno.

45 A estos grupos se les dio la misma dieta, pero conteniendo además 0, 0.625, 1.25, 2.5,5 o 10 % (p/p) de *R. rubrum* liofilizado. El contenido de colesterol de la dieta fue mantenido a 0.25% añadiendo colesterol según fuera necesario.

[0078] Durante el experimento, el peso corporal y la ingesta alimenticia fueron monitoreados.

50 Después del cambio dietético, la sangre fue tomada semanalmente para determinar el colesterol en el plasma y los niveles de triglicéridos.

También, el modelo lipoproteínico de plasma fue determinado en grupos en muestras agrupadas por fplc.

Además, se recogieron heces semanalmente en una base de grupo.

55 Después de tres semanas, la secreción de VLDL fue medida en los grupos alimentados con 0% y 10% de *R. rubrum* (experimento terminal).

El grupo alimentado con 0.625% de *R. rubrum* fue luego cambiado a una dieta conteniendo 0% de *R. rubrum*, el grupo alimentado con 2.5% de *R. rubrum* a 5% de *R. rubrum*, y el grupo alimentado con 5% de *R. rubrum* a 10% de *R. rubrum*, para reemplazar los dos grupos sacrificados.

Después de otra semana, la sangre fue nuevamente recogida de los cuatro grupos restantes.

60 Los resultados se pueden resumir de la siguiente manera:

- el nivel de colesterol en el plasma fue significativamente reducido en los grupos alimentados con 5% o 10% de *R. Rubrum*
- la reducción de colesterol fue ya muy significativa después de una semana en el grupo de 10% de *R. rubrum* ( $p<0.0001$ ), y después de dos semanas también en el grupo de 5% de *R. rubrum* ( $p<0.001$ ), y se mantuvo así durante el período de tres semanas (figura 6)

65

- este nivel de colesterol inferior fue debido a una reducción de colesterol en las fracciones de VLDL y LDL, mientras la cantidad de colesterol en las fracciones de HDL no cambiaron (figura 7).

[0079] Para decidir si la reducción de colesterol fue debida a la inhibición de la síntesis del colesterol, la concentración en el plasma de latosterol, un producto secundario de la vía de síntesis de colesterol, fue medida (Kempen et al, 1988).

El nivel de latosterol en el plasma no era diferente significativamente entre los grupos alimentados con 0,5 o 10% de *R.rubrum*; mientras, como se ha mencionado anteriormente, el nivel de colesterol en el plasma fue inferior significativamente en los grupos del 5% y 10% (figura 8).

La proporción de latosterol en el plasma a colesterol en el plasma aumentó incluso significativamente en los ratones alimentados con *R. rubrum* (ANOVA < p<0.026).

Ya que la concentración de latosterol (relativa) es una buena reflexión del índice de síntesis de colesterol (Kempen et al, 1988), se puede concluir que la reducción de colesterol en el plasma en los grupos alimentados con 5% y 10% de *R. rubrum* no se debió a un índice disminuido de síntesis de colesterol.

[0080] Los niveles de plasma de campesterol y  $\beta$ -sitosterol, dos esteroides que ocurren solo en plantas y pueden así solo estar presentes en el plasma después de la absorción desde los intestinos, disminuyeron significativamente en los grupos alimentados bien con 5% o 10% de *R. rubrum* (Figura 9).

La proporción de la concentración en el plasma de  $\beta$ -sitosterol a colesterol no cambió significativamente (ANOVA; p=0.26), sin embargo; tampoco cambió la proporción de campesterol a colesterol en el plasma. (ANOVA, p=0.98).

Ya que la concentración de colesterol en el plasma se determina por su índice de síntesis y su índice de absorción desde los intestinos, el hecho de que estas proporciones se mantuvieran similares (campesterol,  $\beta$ -sitosterol; comparar Miettinen et al, 1990) o aumentadas (latosterol) demuestra que la reducción en la concentración de colesterol en el plasma no puede deberse a una reducción en la síntesis de colesterol, pero debe más bien ser atribuida a una absorción disminuida de esteroides desde el lumen intestinal.

[0081] La síntesis de VLDL por el hígado (medida como se describe por Post et al, 2000) no era diferente significativamente en el grupo alimentado con 10% de *R. rubrum*, respecto al grupo de control (figura 10a,b).

Aunque, después de la inyección de Triton WR1339, concentraciones de triglicéridos en el plasma aumentaron más rápidamente en el grupo alimentado con 10% de *R. rubrum* que en el grupo de control (figura 10a), esto debería ser atribuido a la cantidad más alta de triglicéridos en la fracción de VLDL de los ratones alimentados con *R. rubrum* (figura 10b), antes que a un aumento en la secreción de partículas de VLDL por el hígado.

[0082] La excreción fecal de esteroides neutros (especialmente colesterol) aumentó en los ratones tratados con *R. rubrum* (Figura 11), mientras la excreción fecal de ácidos biliares también aumentó ligeramente (figura 12).

En consecuencia, la excreción fecal de todos los esteroides conjuntamente (esteroides neutros más ácidos biliares) aumentó (figura 13) (ver también tablas 1a y b).

#### Ejemplo 9. Efecto de una fracción de membrana de nivel de colesterol en el plasma de *Rhodospirillum rubrum* en ratones APOE\*3Leiden.

[0083] Cinco gramos de *R. rubrum* liofilizado fueron suspendidos en 25 ml de agua, y sometidos a ultrasonidos en un Branson Sonifier B-12 durante un minuto a potencia completa.

El producto sometido a ultrasonidos fue luego centrifugado a 21.000 r.p.m., y el sobrenadante y granulado fueron separados.

El granulado fue resuspendido y recentrifugado.

Granulado y sobrenadante fueron mezclados por separado en la dieta occidental (anteriormente descrita) conteniendo 0.25% de colesterol al 10% (p/p), asumiendo tanto granulado como sobrenadante para ser equivalente a 5 gramos de *R. rubrum* liofilizado (es decir, el material inicial).

Grupos de seis ratones APOE3\*Leiden fueron alimentados con dieta occidental, o la dieta occidental pero también con el material (membranoso) de granulado, o la dieta occidental pero también conteniendo el material citoplásmico, durante dos semanas.

En la semana 2, el colesterol en el plasma fue  $15.7 \pm 1.6$  mmol/L en los ratones alimentados con la dieta de control occidental, en los ratones alimentados con la dieta occidental también conteniendo el material citoplásmico, el colesterol en el plasma fue  $14.4 \pm 2.1$  mmol/L, mientras en los ratones alimentados con la dieta occidental también conteniendo el material membranoso, el colesterol en el plasma fue  $6.7 \pm 0.9$  mmol/L, una reducción significativa del 57% con respecto al grupo de control (prueba T; p<0.001).

#### Ejemplo 10. Efecto de nivel de colesterol en el plasma de *Phaeospirillum molischianum* en ratones APOE\*3Leiden.

(Ejemplo de referencia)

[0084] Once ratones APOE\*3Leiden fueron alimentados con la dieta "tipo occidental" (ver arriba) conteniendo 0,25% (p/p) de colesterol.

Esta dieta aumentó su nivel de colesterol en el plasma a  $9 \pm 3$  mmol/L.

5 Posteriormente, los ratones fueron aleatorizados, basándose en su nivel de colesterol en el plasma, en grupos de seis ratones cada uno.

A los dos grupos se les dio la misma dieta, pero conteniendo además 0 o 10 % (p/p) de *Phaeosporillum molischianum* liofilizado, como se ha descrito anteriormente para *R. rubrum*. Después de diez días de alimentación, el colesterol en el plasma se calculó según el promedio  $10 \pm 4$  mmol/L en el grupo al que no se le dio *P. Molischianum* (prueba T combinada: no significativa), y  $5 \pm 2$  mmol/L en el grupo al que se le dio 10% de *P. Molischianum* en el pienso (prueba T combinada:  $p < 0.05$ ).

En resumen:

15 [0085]

Estos experimentos muestran que la adición de 5% (p/p) o 10% (p/p) de *R. rubrum* a una dieta "tipo occidental" reduce significativamente, en ratones APOE\*3Leiden, los niveles de colesterol en el plasma.

Esta reducción

20 1. puede completamente ser atribuida a una reducción de colesterol llevado en partículas LDL y VLDL (proaterogénico), mientras colesterol HDL (antiaterogénico) permanece invariado;

2. no es provocada por una reducción en la síntesis de colesterol, ya que los niveles de colesterol en el plasma no cambian, mientras la síntesis/secreción de VLDL por el hígado es invariada también;

3. no se debe a una excreción aumentada de ácidos biliares, que es poco aumentada; pero

25 4. es por lo tanto muy probablemente debida a una absorción disminuida de esteroides desde los intestinos, como se refleja por la excreción aumentada de colesterol en las heces (ver tabla 1a), y la reducción en las concentraciones en el plasma de campesterol y  $\beta$ -sitosterol .

5. es provocada por material celular membranoso, no por material celular citoplasmático soluble.

30 [0086] El efecto reductor del colesterol es provocado por *R. rubrum* cultivado bajo condiciones diferentes, es provocado por al menos dos cepas diferentes de *R. rubrum* (ATCC 25903 y DSM 467), y es también provocado por unas especies relacionadas, *P. molischianum*.

<b>Tabla 1a</b>				
<b>Equilibrio de esterol en ratones APOE*3Leiden alimentados con dieta de "tipo occidental", que contiene 0,25% (p/p) de colesterol y cantidades variables de <i>R. rubrum</i></b>				
Concentración de <i>R. rubrum</i> en la dieta (% p/p)	ENTRADA colesterol en la comida ingerida (a)	SALIDA esteroides excretados en heces (b)	SALIDA ácidos biliares excretados en heces	SALIDA total excretada en las heces
	0	78	38	14
52	0.625	78	41	18
59	1.25	78	52	17
69	2.5	78	48	15
63	5	78	63	17
80	10	78	68	25
93				

35 [0087] Todos los datos se expresan como  $\mu$ mol por 100 gramos de ratón al día

<b>Tabla 1b</b>			
<b>Absorción de colesterol Intestinal en ratones APOE*3Leiden alimentados con dieta "tipo occidental", que contiene 0,25% (p/p) colesterol y cantidades variables de <i>R. rubrum</i></b>			
Concentración de <i>R. rubrum</i> en la dieta (% p/p)	Colesterol absorbido ( $\mu$ moles por 100 gramos de peso corporal al día) [(a) menos (b)]	Colesterol absorbido (como % de entrada)	Colesterol absorbido (como % de grupo de control)
0	40	51	100
0.625	37	48	93
1.25	26	33	64
2.5	30	38	75
5	15	19	37
10	10	12	24

(a) y (b) se refieren a tabla 1a.

Referencias

[0088]

- 5 1. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Bacterial nomenclature up-to-date. Accessed December 6th, 2003. <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>.
2. Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature. Accessed December 6th, 2003. <http://www.bacterio.cict.fr/qr/rhodospirillum.html> and <http://www.bacterio.cict.fr/qr/phaeospirillum.html>.
3. Hassel CA. Animal models: new cholesterol raising and lowering nutrients. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:7-10.
- 10 4. Imhoff JF, Trüper HG. The genus *Rhodospirillum* and related genera. Chapter 101 in: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer-Verlag, New York/Berlin/Heidelberg, Volume III, 2<sup>a</sup> edición 1992, pp. 2141-2155.
- 15 5. Imhoff JF, Petri R, Suling J. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic non-sulfur bacteria of the alpha-Proteobacteria: description of the new genera *Phaeospirillum* gen.nov., *Rhodovibrio* gen.nov., *Rhodothalassium* gen.nov. and *Roseospira* gen.nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb.nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum* comb.nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salexigens*. *Int J System Bacteriol* 1998; 48: 793-798.
- 20 6. Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA, Katan MB. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res* 1988; 29: 1149-1155.
7. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesäniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 20-31.
8. Nishina PM, Verstuyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res* 1990; 31: 859-869.
- 25 9. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*. National Academy of Sciences publication #10, 3rd revised edition. Washington DC, 1978.
10. Post SM, de Roos B, Vermeulen M, Afman L, Jong MC, Dahlmans VEH, Havekes LM, Stellaard F, Katan MB, Princen HMG. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E\*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20: 1551-1556.
- 30 11. Segers L, Verstraete W. Conversion of organic acids to H<sub>2</sub> by *Rhodospirillaceae* grown with glutamate or dinitrogen as nitrogen source. *Biotechnol Bioeng* 1983; 25: 283-2853.
12. Van Vlijmen BJM, van 't Hof HB, Mol MJTM, van der Boom H, van der Zee A, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Modulation of very low density lipoprotein production and clearance contributes to age and gender-dependent hyperlipoproteinaemia in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Clin Invest* 1996; 97: 1184-1192.
- 35 13. Van Vlijmen BJ, Pearce NJ, Bergo M, Staels B, Yates JW, Gribble AD, Bond BC, Hofker MH, Havekes LM, Groot PH. Apolipoprotein E\*3-Leiden transgenic mice as a test model for hypolipidaemic drugs. *Arzneimittelforschung* 1998; 48:396-402.
- 40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. para uso como un medicamento.
2. Preparación para uso según la reivindicación 1, donde dicho uso es para reducir el colesterol en el plasma.
- 10 3. Uso de una preparación comprendiendo la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. para la producción de un medicamento para reducir el colesterol en el plasma.
4. Suplemento alimenticio con propiedades reductoras de colesterol, que comprende una preparación de la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp.
- 15 5. Alimento que comprende un suplemento alimenticio según la reivindicación 4.
- 20 6. Método para la producción de una preparación de la fracción de membrana de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. según la reivindicación 1, que comprende el cultivo de una o más células de *Rhodospirillum* spp. y/o *Phaeospirillum* spp. a un cultivo multicelular, someter a ultrasonidos dichas células, separando el material membranoso del material citoplasmático por centrifugación, seguido de otro paso de lavado y de recentrifugación.
7. Método para la producción de un suplemento alimenticio según la reivindicación 4, que comprende la fabricación adecuada para consumo de una preparación según la reivindicación 1.
- 25 8. Método para la producción de un alimento según la reivindicación 5, que comprende la incorporación de un suplemento alimenticio según la reivindicación 4 en un alimento.

Figura 1

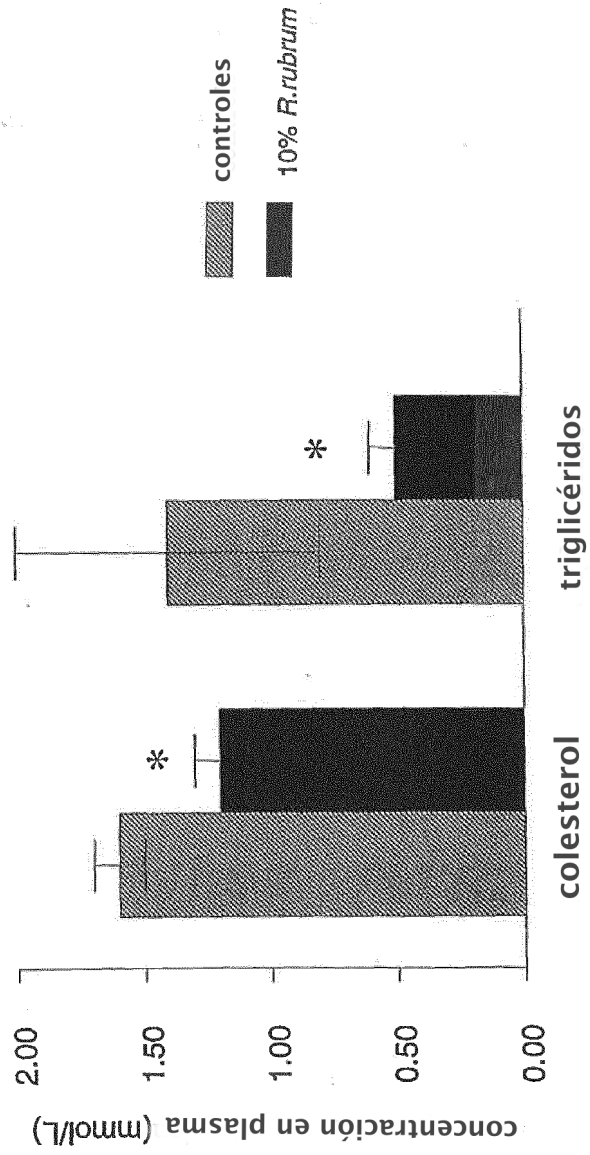


Figura 2

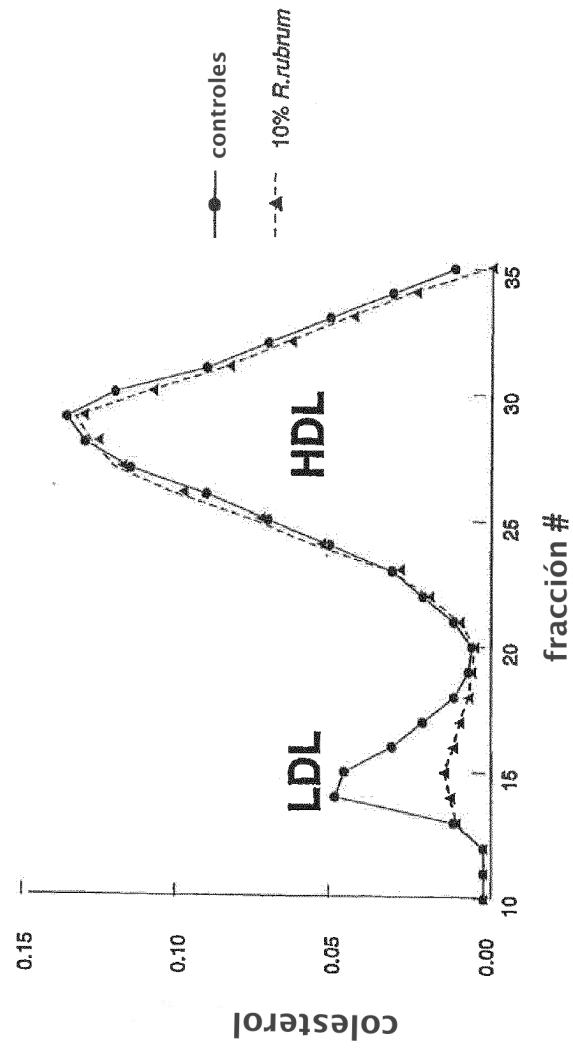




Figura 3

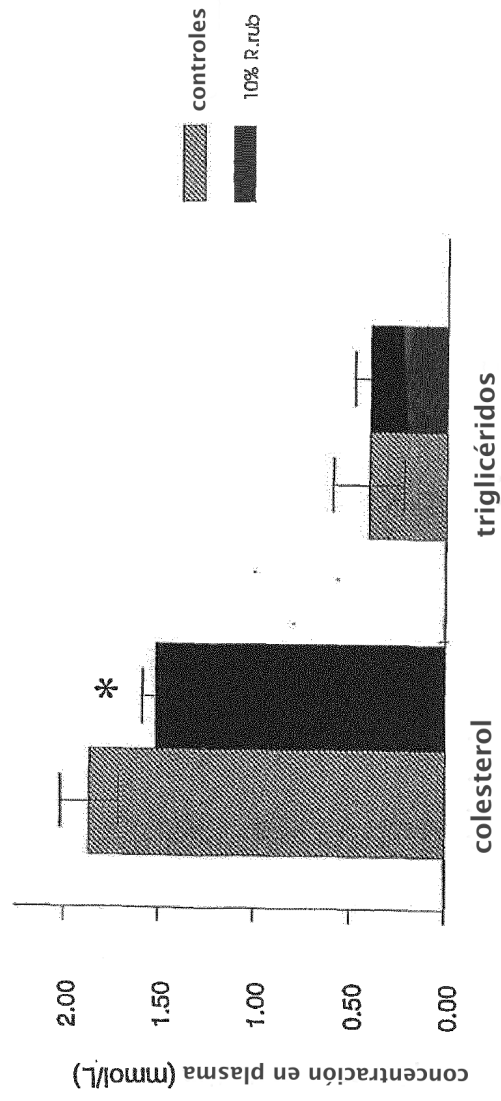


Figura 4

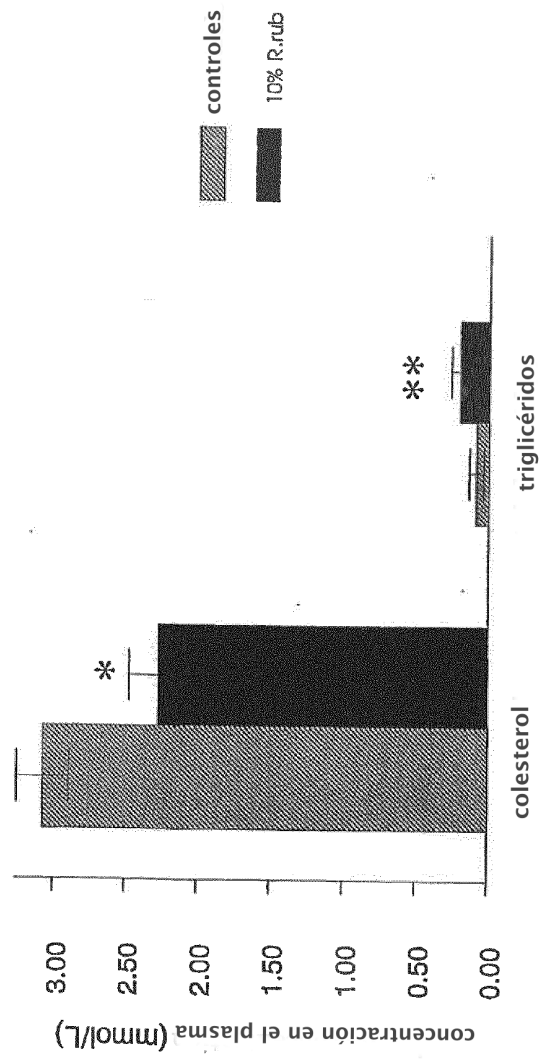


Figura 5

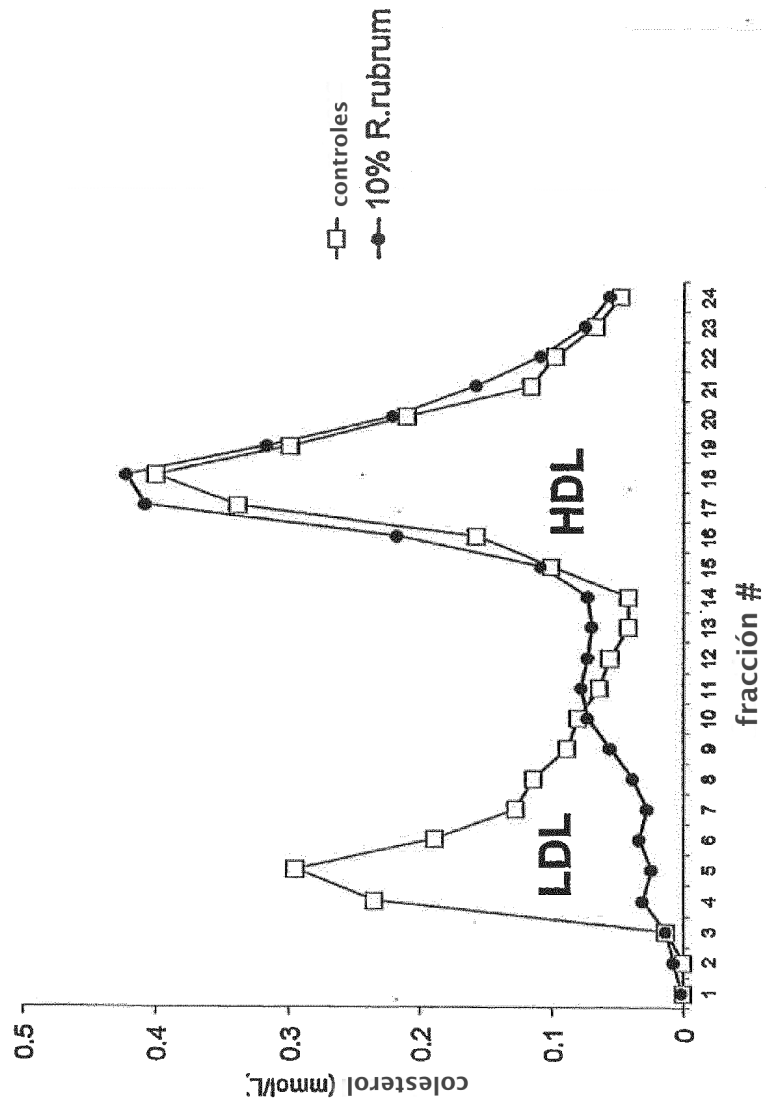


Figura 6

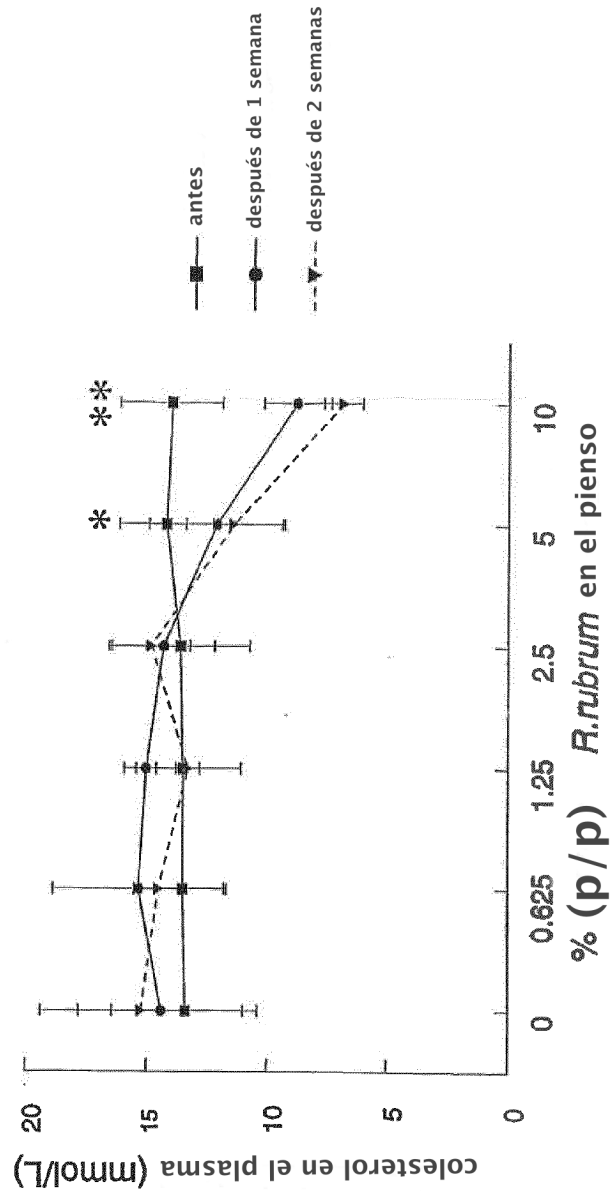


Figura 7

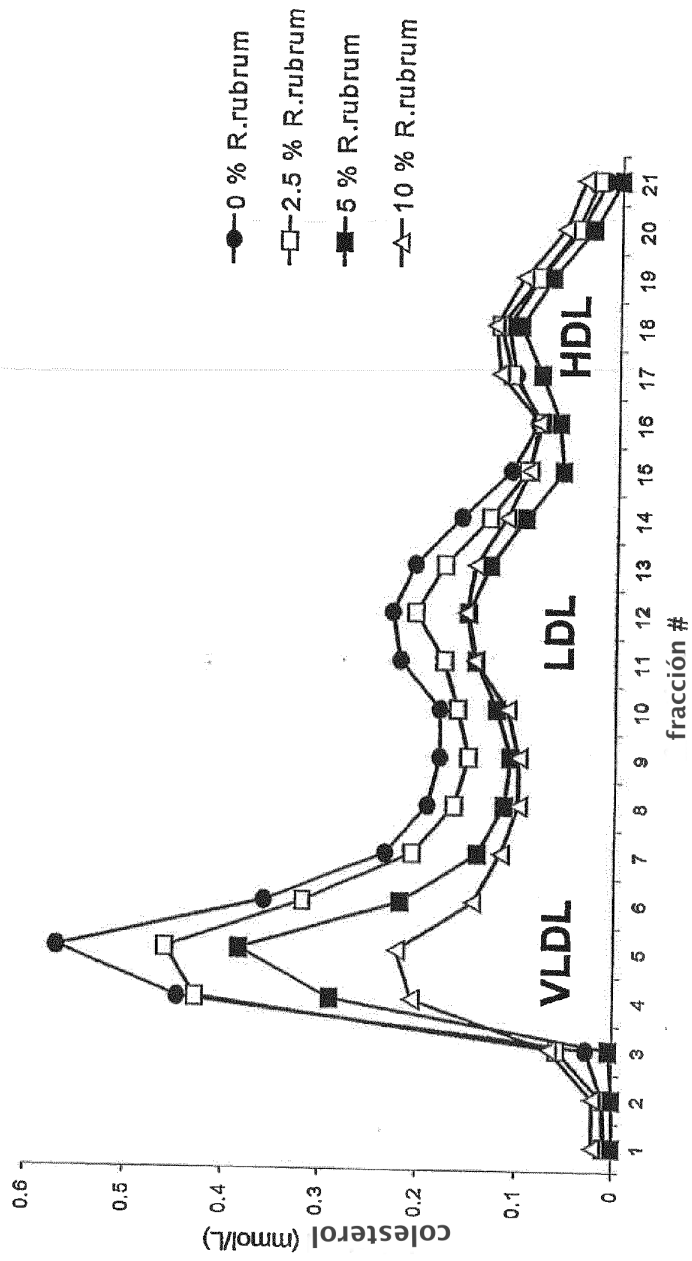


Figura 8

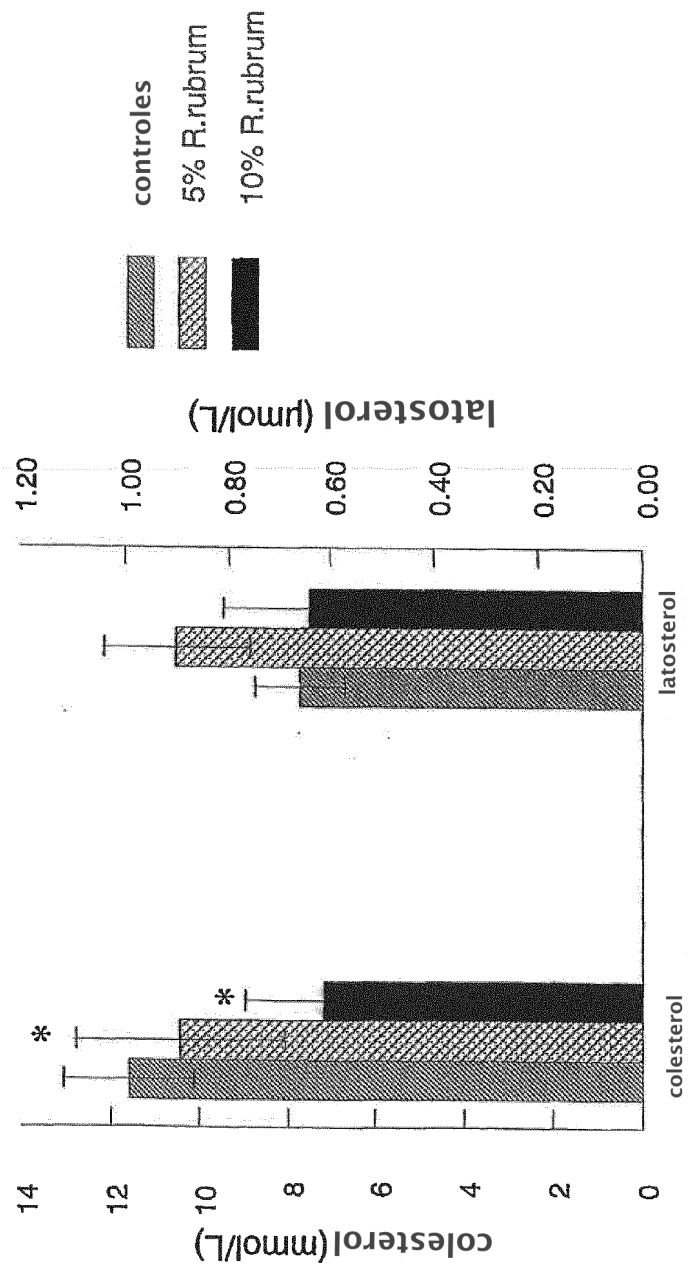


Figura 9

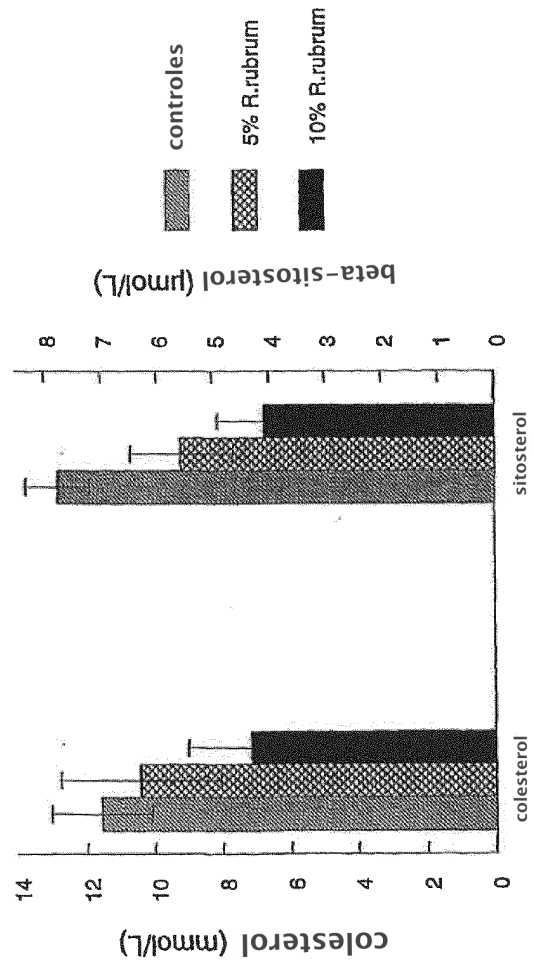


Figura 10

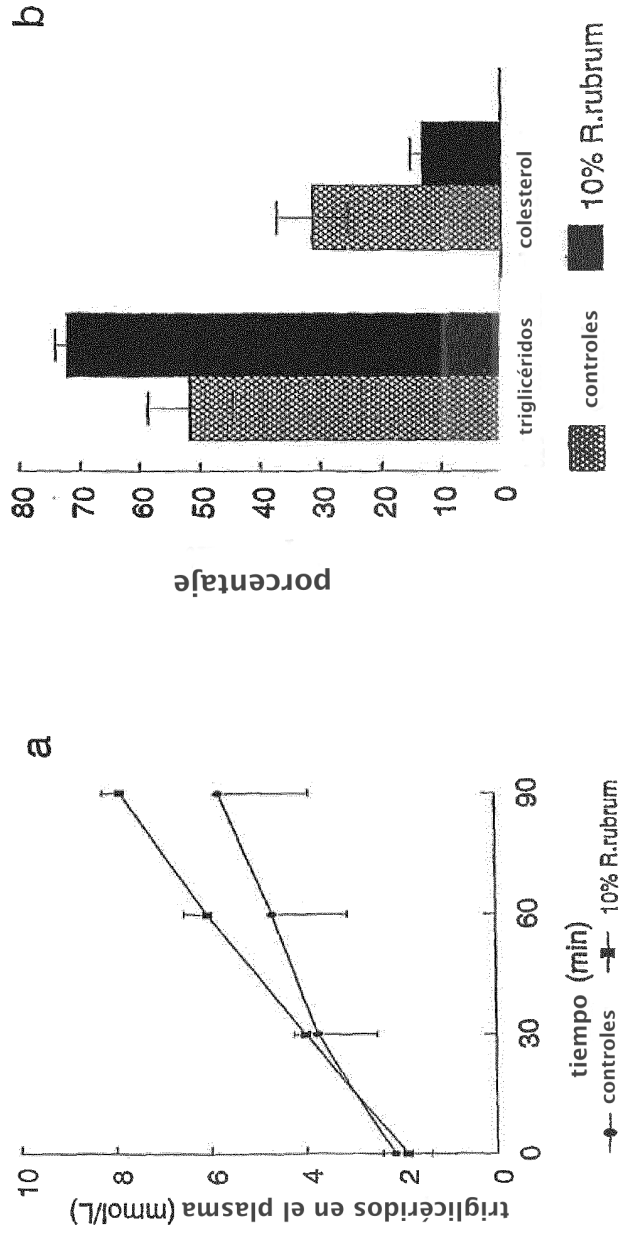




Figura 11

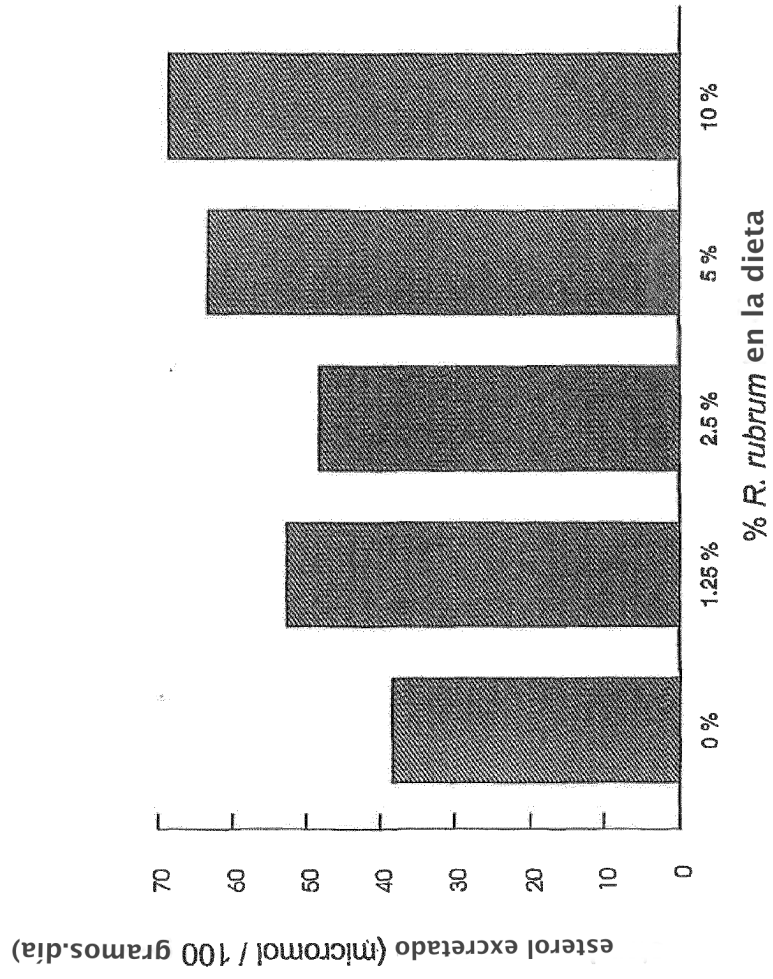


Figura 12

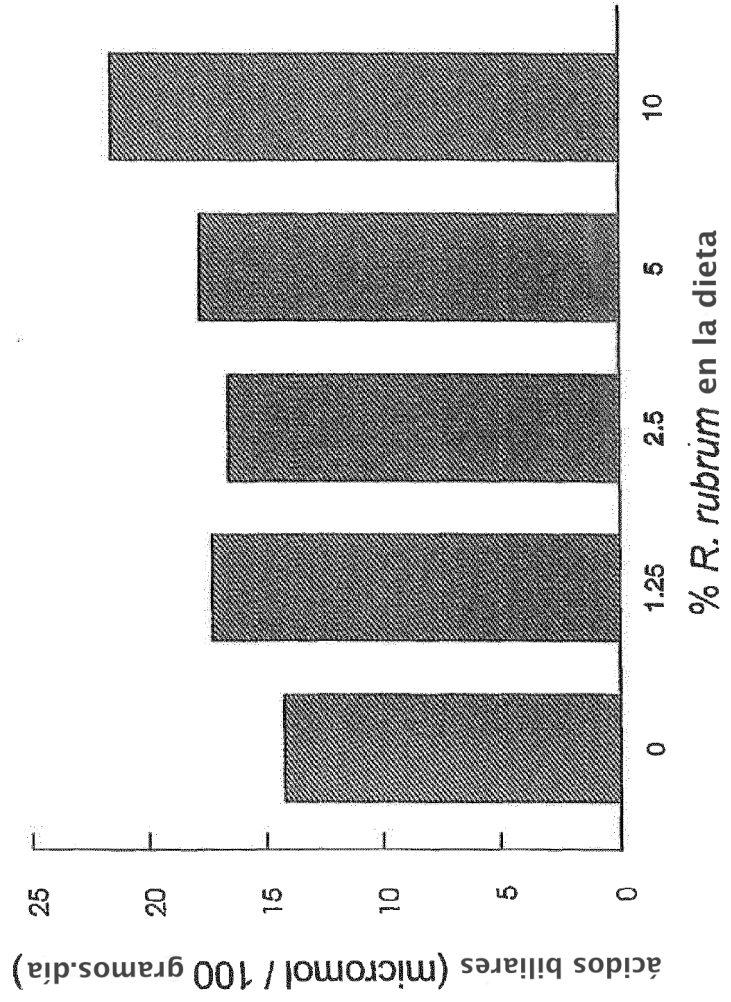


Figura 13

