

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 048**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/064** (2006.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2011** **E 11152394 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017** **EP 2356993**

54 Título: **Medicamento para la reducción de la colesterolemia y de la trigliceridemia**

30 Prioridad:

**27.01.2010 FR 1050537**

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

**31.10.2017**

73 Titular/es:

**BIOCODEX (100.0%)  
7, avenue Gallieni  
94250 Gentilly, FR**

72 Inventor/es:

**GIRARD, PHILIPPE;  
VERLEYE, MARC;  
LE GUERN, MARIE-EMMANUELLE y  
HUBLLOT, BERNARD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 640 048 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

Medicamento para la reducción de la colesterolemia y de la trigliceridemia

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un medicamento destinado a reducir la colesterolemia y/o la trigliceridemia en un individuo que presenta factores de riesgo cardiovascular o a prevenir o tratar la hipercolesterolemia y/o la hipertrigliceridemia en un individuo.

**Antecedentes de la técnica**

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo importante de enfermedades cardiovasculares, tales como la aterosclerosis, el infarto de miocardio y las enfermedades cerebrovasculares.

10 El tratamiento de primera línea para la hipercolesterolemia es un régimen alimenticio adaptado pobre en colesterol. Si el cambio del régimen alimenticio resulta insuficiente para tratar la hipercolesterolemia, se consideran entonces tratamientos farmacológicos, especialmente a base de inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) y de fibratos.

15 Otros diversos medios de tratamiento de la hipercolesterolemia están igualmente disponibles, en particular como complemento del régimen alimenticio adaptado, tales como los fitosteroles, que se encuentran incorporados en numerosas preparaciones alimentarias, o los probióticos, especialmente bacterianos.

20 Debido a sus otras propiedades interesantes para la salud humana y a la práctica ausencia de efectos secundarios, se ha propuesto así utilizar numerosos probióticos diferentes en el marco del tratamiento de la hipercolesterolemia. Sin embargo, esto se basa lo más a menudo en estudios *in vitro* de extracción del colesterol por los probióticos a partir de un medio de cultivo. Ahora bien, estos estudios no son directamente indicativos de un efecto anti-hipercolesterolémico *in vivo*. Por lo tanto, sobre la base de estudios *in vitro*, se ha podido sugerir que *Lactobacillus rhamnosus* puede ejercer un efecto anti-hipercolesterolémico (Xanthopoulos et al. (1998) Microbiologie, Aliments, Nutrition 16: 199-203), aunque no se observa ningún efecto *in vivo* (Hattaka et al. (2008) J. Am. Coll. Nutr. 27: 441-447).

25 De hecho, en la actualidad, no ha podido ser demostrado de manera adecuada un verdadero efecto anti-hipercolesterolémico por experimentos *in vivo* más que para un pequeño número de probióticos. Se puede citar como tal, una asociación de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus faecalis* (Fukushima & Nakano (1996) Br. J. Nutr. 76: 857-867) o una asociación de probióticos compuesta de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces* y *Candida* (Fukushima & Nakano (1995) Br. J. Nutr. 73: 701-710).

30 *Saccharomyces boulardii* (Ultra-Levure®) es una cepa particular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este probiótico está principalmente indicado como complemento de la rehidratación para el tratamiento de las diarreas. Su utilidad ha sido establecida especialmente en los niños (Villarruel et al. (2007) Acta Pediatr. 96: 538-541; Szajewska et al. (2007) Aliment Pharmacol Ther. 25: 257-264) y para las diarreas relacionadas con la toma de antibióticos (Surawicz et al. (1989) Gastroenterology 96: 981-988; Kotowska et al. (2005) Aliment Pharmacol Ther 21: 583-590) o en las infecciones por *Clostridium difficile* (Surawicz et al. (2000) Clin. Infect. Dis. 31: 1012-1017).

35

**Resumen de la invención**

40 La presente invención se deriva de la demostración inesperada, por los inventores, de que el *Saccharomyces boulardii* permitía reducir la hipercolesterolemia y la hepatomegalia inducidas en la rata por un régimen enriquecido en colesterol, así como la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia inducidas en el hámster por un régimen enriquecido en colesterol.

Así, la presente invención se refiere a las células de levadura de *Saccharomyces boulardii* para su utilización en la reducción de la colesterolemia y/o de la trigliceridemia en un individuo que presenta factores de riesgo cardiovascular o en la prevención o el tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia en un individuo.

45 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende como sustancias activas:

- células de la levadura *Saccharomyces boulardii*, y
- al menos un compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia seleccionado en el grupo constituido por una estatina, un fibrato y un fitosterol, eventualmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en particular para su utilización en la reducción de la

colesterolemia y/o de la trigliceridemia en un individuo, más particularmente para tratar la hipercolesterolemia y/o la hipertrigliceridemia.

La presente invención se refiere también a productos que contienen:

- células de la levadura *Saccharomyces boulardii*, y
- 5 – al menos un compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia,

como un producto de combinación para una utilización simultánea, separada o escalonada en el tiempo para la reducción de la colesterolemia y/o de la trigliceridemia en un individuo que presenta factores de riesgo cardiovascular, especialmente para tratar la hipercolesterolemia y/o la hipertrigliceridemia.

## 10 Descripción de la figura

La figura representa el efecto de *Saccharomyces boulardii* administrado a 3 g/kg/día sobre el aumento de la colesterolemia de las ratas (eje de las ordenadas, en mg/dl) inducido por un régimen alimenticio enriquecido en colesterol al 2%, en función del tiempo (eje de las abscisas, en días). El régimen enriquecido en colesterol y el *S. boulardii* se administran a partir del día 0 y día 4 respectivamente. \*: p <0,05, prueba estadística ANOVA con medidas repetidas de los grupos tratados en comparación con el grupo testigo y #: p <0,05 para el grupo de *S. boulardii* + colesterol en comparación con el grupo de colesterol solo. El grupo de ratas testigos está representado por los círculos abiertos, el grupo de ratas que reciben un régimen alimenticio normal y *S. boulardii* está representado por cuadrados negros, el grupo de ratas que reciben un régimen alimenticio enriquecido en colesterol está representado por círculos negros, y el grupo de ratas que reciben un régimen alimenticio enriquecido en colesterol y *S. boulardii* está representado por triángulos negros.

## Descripción detallada de la invención

El término "colesterolemia" es bien conocido por los expertos en la técnica. Representa un nivel de colesterol en sangre, y especialmente el nivel de colesterol total en suero. La colesterolemia se expresa especialmente en g/l o en mmol/l.

25 Tal como se entiende en la presente memoria, la expresión "reducir la colesterolemia" significa especialmente disminuir el nivel sérico de colesterol total.

El término "hipercolesterolemia" designa una colesterolemia patológica. La hipercolesterolemia designa en particular una colesterolemia superior a 2 g/l, más particularmente superior a 2,4 g/l en los seres humanos.

30 Las expresiones "en el tratamiento de la hipercolesterolemia" y "para tratar la hipercolesterolemia" son sinónimas y significan disminuir, en particular para que vuelva a ser normal, la colesterolemia en un individuo que presenta una hipercolesterolemia.

El individuo en el que se quiere reducir la colesterolemia puede presentar una hipercolesterolemia. El individuo puede presentar también una colesterolemia que no es en sí misma patológica, es decir, que es con preferencia inferior o igual a 2 g/l, pero que es suficientemente elevada para hacer que sea deseable una disminución de la colesterolemia, por ejemplo, si el individuo presenta otros factores de riesgo cardiovascular o en prevención de una hipercolesterolemia. Así, el individuo según la invención puede presentar una colesterolemia superior a 1,8 g/l e inferior o igual a 2 g/l.

40 En particular, el individuo según la invención puede presentar una hipercolesterolemia, especialmente moderada, es decir que presenta una colesterolemia con preferencia superior a 2 g/l y con preferencia inferior o igual a 2,4 g/l, y está sometido a un régimen alimenticio bajo en colesterol.

Se denomina "régimen alimenticio bajo en colesterol" un régimen en el que la cantidad de colesterol está disminuida en comparación con un régimen alimenticio normal. Los expertos en la técnica saben definir bien un régimen bajo en colesterol. En particular, en un régimen bajo en colesterol, la cantidad de colesterol es inferior a la cantidad de colesterol que se encuentra habitualmente en el régimen alimenticio del individuo antes de que empiece a utilizar el régimen bajo en colesterol.

El término "trigliceridemia" es bien conocido también por los expertos en la técnica. Representa un nivel de triglicéridos en sangre, y especialmente el nivel de triglicéridos totales en suero. La trigliceridemia se expresa, especialmente en g/l o en mmol/l.

50 Tal como se entiende en la presente memoria, la expresión "reducir la trigliceridemia" significa especialmente disminuir el nivel sérico de triglicéridos totales.

El término "hipertrigliceridemia" designa una trigliceridemia patológica. La hipertrigliceridemia designa en particular una trigliceridemia superior a 1,5 g/l, más preferiblemente superior a 5 g/l.

Las expresiones "en el tratamiento de la hipertrigliceridemia" y "para tratar la hipertrigliceridemia" son sinónimas y significan disminuir, en particular para que vuelva a ser normal, la trigliceridemia en un individuo que presenta una hipertrigliceridemia.

El individuo en el que se quiere reducir la trigliceridemia puede presentar una hipertrigliceridemia. El individuo puede presentar también una trigliceridemia que no es en sí misma patológica, es decir, que es con preferencia inferior o igual a 1,5 g/l, pero que es suficientemente elevada para hacer que sea deseable una disminución de la trigliceridemia, por ejemplo, si el individuo presenta otros factores de riesgo cardiovascular o en prevención de una hipertrigliceridemia. Así, el individuo según la invención puede presentar una trigliceridemia superior a 1,3 g/l e inferior a 1,5 g/l para un hombre, o superior a 1,1 g/l e inferior a 1,5 g/l para una mujer.

El individuo según la invención es un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano.

Tal como se entiende en la presente memoria, la expresión "células de levadura" agrupa las células de levadura viables o muertas, enteras o en forma de restos. Preferiblemente, al menos una parte de las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención son viables.

La viabilidad de una célula de levadura se define como la capacidad de una célula de levadura para multiplicarse. El número de células viables en una muestra se puede estimar determinando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) comprendidas en la muestra.

A modo de ejemplo, el número de UFC de células de levadura de una muestra líquida que comprende las levaduras se puede determinar extendiendo un volumen determinado de la muestra sobre un medio sólido, por ejemplo agar, permitiendo el crecimiento de las levaduras e incubando el medio sólido durante un período de tiempo, por ejemplo 48 h, y a una temperatura, por ejemplo 30 °C, que permita el crecimiento de colonias de levaduras. El número de colonias con respecto al volumen extendido sobre el medio sólido permite determinar el número de unidades formadoras de colonias comprendidas en la muestra. Un protocolo detallado de la determinación de UFC según la invención está especialmente descrito en Toothaker & Elmer (1984) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26: 552-556 en el párrafo "Assay for *S. boulardii*". Por otra parte, cuando la muestra de levadura se presenta en la forma de un sólido, por ejemplo, un polvo liofilizado, se prefiere determinar el número de UFC comprendido en la muestra después de haber recogido una masa determinada de la muestra en una solución acuosa, especialmente en agua destilada o en una solución de NaCl al 0,9% a pH 7.

Una "levadura" según la invención es un hongo preferiblemente unicelular. Las células de levadura según la invención son de la especie *Saccharomyces boulardii*. *Saccharomyces boulardii* es bien conocido por los expertos en la técnica y está especialmente descrito en Hennequin et al. (2001) *J. Clin. Microbiol.* 39: 551-559.

De manera particularmente preferida, las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se obtienen de medicamentos de la marca Ultra-Levure®, Bioflor®, Codex®, Econorm®, Enflor®, Enterol®, Florastor®, Floratil®, Florestor®, Inteflora®, Perenterol®, Perenteryl®, Precosa®, Reflor®, Ultra-Levura® o a partir de los depósitos efectuados en la *American Type Culture Collection* (ATCC, USA) bajo la referencia 74012 o en la *Collection Nationale de Culture et de Microorganismes* (CNCM, Francia) bajo la referencia I-745.

Preferiblemente, también las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención están liofilizadas, tales como las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* de marca Ultra-Levure®, Bioflor®, Codex®, Econorm®, Enflor®, Enterol®, Florastor®, Floratil®, Florestor®, Inteflora®, Perenterol®, Perenteryl®, Precosa®, Reflor®, o Ultra-Levura®.

De manera ventajosa, la viabilidad y la vitalidad de las células de levadura obtenidas a partir de liofilizados son superiores a las que se pueden obtener a partir de otro modo de conservación de las células de levadura.

Tal como se entiende en la presente memoria, la "liofilización" es un método de conservación en el que las células de levadura se congelan y después se someten a una sublimación del agua congelada que contienen para dar un liofilizado en la forma de un polvo de levadura seco, que contiene preferiblemente menos de 2% de agua y más preferiblemente menos de 1% de agua. Preferiblemente, las células de levadura liofilizadas se obtienen a partir de concentrados de células de levadura. No importa qué tipo de método de liofilización de células de levadura conocido por los expertos en la técnica pueda ser utilizado. Sin embargo, las células de levadura preferiblemente se liofilizan según la invención utilizando el siguiente método de liofilización:

- cultivar las células de levadura en un medio nutritivo líquido hasta que las células alcancen una fase estacionaria;
- concentrar las células de levadura cultivadas y congelar el concentrado;

- liofilizar el concentrado.

Preferiblemente, las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se administran en forma de cápsulas o de sobres.

- 5 También preferiblemente, las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se administran a una dosis de  $0,5 \cdot 10^8$  a  $100 \cdot 10^{10}$  UFC/kg/día o a una dosis de 0,00125 g/kg/día a 25 g/kg/día.

Por otra parte, la composición farmacéutica tal como se ha definido antes, o los productos tales como se han definido antes, comprenden, preferiblemente, una dosis de 50 a 250 mg de células de la levadura *Saccharomyces boulardii*. Además, las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso tal como se ha definido anteriormente se administran preferiblemente en una dosis unitaria de 50 a 250 mg.

- 10 Como los expertos en la técnica entenderán, la cantidad de células de levadura a administrar por unidad de masa (kg) se refiere a la masa del individuo al que se destinan las células de levadura. Por otra parte, cuando la cantidad de células de levadura a ser administrada se expresa en unidades de masa (g), las células de levadura están preferiblemente en forma liofilizada.

- 15 Tal como se entiende en la presente memoria, la expresión "compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia" agrupa el conjunto de los compuestos utilizados para reducir la colesterolemia, especialmente en un individuo que sufre hipercolesterolemia. Estos compuestos pueden ser de cualquier tipo y cubren especialmente los compuestos farmacológicos, los probióticos y los prebióticos. Se prefiere, sin embargo, que el compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia según la invención sea seleccionado del grupo constituido por una estatina, un fibrato, niacina, y un fitosterol.

- 20 De la misma manera, la expresión "un compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipertrigliceridemia" agrupa el conjunto de los compuestos utilizados para reducir la trigliceridemia, especialmente en un individuo que sufre de hipertrigliceridemia. Estos compuestos pueden ser de cualquier tipo y cubren especialmente los compuestos farmacológicos, los probióticos y los prebióticos. Se prefiere, sin embargo, que el compuesto adicional destinado al tratamiento de la trigliceridemia según la invención sea seleccionado del grupo constituido por una estatina, un fibrato, niacina, y un fitosterol.
- 25

Sin embargo, en un modo de realización particular de la invención, las células de la levadura *S. boulardii*:

- para su utilización según la invención en la reducción de la colesterolemia y/o de la trigliceridemia en un individuo que presenta factores de riesgo cardiovascular, especialmente para tratar la hipercolesterolemia y/o la hipertrigliceridemia, o
- 30 - cuando se utilizan para la reducción de la colesterolemia y/o de la trigliceridemia, en particular para el tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia, no se asocian, ni se administran conjuntamente, con la niacina o con el ácido linoleico, o con otro ácido graso poliinsaturado, o más generalmente no se asocian, ni se administran conjuntamente con un compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia tal como se ha definido anteriormente. En
- 35 otras palabras, en un modo de realización particular de la invención, las células de la levadura *S. boulardii* para su utilización según la invención o cuando se utilizan según la invención, son el único principio activo destinado a reducir la colesterolemia y/o la trigliceridemia, en particular para tratar la hipercolesterolemia y/o la hipertrigliceridemia.

- 40 Por otra parte, en otro modo de realización particular de la invención, las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* no se administran con otro probiótico, y la composición farmacéutica no comprende más probióticos que el *Saccharomyces boulardii*.

Tal como se entiende en la presente memoria, el término "probiótico" significa cualquier microorganismo, preferiblemente viable, administrado a un individuo, especialmente con vistas a mejorar su estado de salud.

## Ejemplos

- 45 Ejemplo 1

### 1. Materiales y métodos

#### 1.1. Animales

- 50 Se utilizan ratas Sprague Dawley (Janvier), con un peso comprendido entre 200 y 220 gramos al principio del estudio, después de su aclimatación durante al menos 7 días en el animalario ( $t^{\circ} = 22 \pm 2$  °C; humedad:  $50 \pm 20\%$ ; alimentación SAFE "A04"; ritmo circadiano 12 h/12 h).

## 1.2. Protocolo

### 1.2.1. Régimen alimenticio

4 grupos de 8 a 10 ratas se sometieron, respectivamente, a:

- un régimen alimenticio normal "A04" (SAFE)
- 5 – un régimen alimenticio normal con *Saccharomyces boulardii* a 3 g/kg/día,
- un régimen alimenticio que incorpora 2% de colesterol (MP Biomedicals, ref. 904691), y
- un régimen alimenticio que incorpora 2% de colesterol (MP Biomedicals, ref. 904691) suplementado con *Saccharomyces boulardii* a 3 g/kg/día.

### 1.2.2. Extracciones de sangre

- 10 Se extrae sangre de la vena caudal utilizando una aguja Terumo 21 G (ref. NN2125R) y una jeringa Terumo de 2 ml (ref. 55-025) 3 días antes del principio del experimento para determinar la colesterolemia basal. Se utiliza un antihemorrágico (Dycinone®) para detener el eventual derramamiento de sangre.

- 15 La sangre se vierte en un tubo Sarstedt Multivette de 600 µl que contiene un activador de la coagulación (ref. 15.1670). El tubo se centrifuga a 10000 g (14000 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga *Centrifuge 5415C* Eppendorf. Se recupera el suero en varios micro-tubos Sarstedt de 0,5 ml (ref. 72.699), que se ponen a -80 °C antes del análisis.

Se hacen a continuación diferentes extracciones el día del principio del régimen enriquecido en colesterol (día 0) y después los días 4, 7, 11, 14, 18, 21 y 25 después del principio del régimen enriquecido en colesterol.

### 1.2.3. Valoración del colesterol total por colorimetría

- 20 Se prepara una solución madre de colesterol (Sigma, ref. C3045) a 3 g/l disolviendo 30 mg de colesterol en 10 ml de una solución de desoxicolato de sodio a 150 g/l a 40 °C durante 60 min como mínimo. La solución de desoxicolato de sodio se obtiene por disolución de 15 g de desoxicolato de sodio en 100 ml de NaCl al 0,9% agitando después a 40 °C durante 60 min como mínimo.

- 25 Se prepara una escala de patrones por diluciones sucesivas en la solución de desoxicolato de sodio a partir de la solución madre para obtener concentraciones de 0,375; 0,75; 1,5 y 3 g/l de colesterol.

Se mezclan 10 µl de la muestra o del patrón con 1000 µl de reactivo CHOL destinado a medir el colesterol total (Menarini, ref. 30990). 30 min después, se realiza la medida de la absorbancia con respecto a un blanco de reactivo a una temperatura de 37 °C a una longitud de onda de 510 nm, en un espectrofotómetro SPEDCOR 2005 con cubetas que tienen un camino óptico de 1 cm (Spectrovettes Evergreen, Dutscher, ref. 064005).

- 30 1.2.3. Determinación del peso del hígado

Al final del estudio (día 25), se sacrifican las ratas y se extrae y se pesa su hígado.

### 1.3. Productos

El *Saccharomyces boulardii* liofilizado (Ultralevure® lote 4325, Biocodex) se conserva entre 4 y 6 °C, se solubiliza en agua destilada.

- 35 El colesterol (Sigma, ref. C3045) se almacena a -20 °C. El desoxicolato de sodio se obtiene de Fluka (ref. 30970).

El reactivo de valoración CHOL (Menarini) se almacena entre 4 y 6 °C.

### 1.4. Administración

Se administra *Saccharomyces boulardii* por vía oral 4 días después del principio del régimen alimenticio enriquecido en colesterol cuando se ha establecido la hipercolesterolemia.

- 40 2. Resultados

No se observa ninguna diferencia significativa en el peso de los animales en función del régimen alimenticio al que han sido sometidos.

Los resultados se resumen en la Tabla 1 que sigue y en la Figura.

Tabla 1: Efecto de *S. boulardii* administrado a 3 g/kg/día sobre el aumento de la colesterolemia (mg/dl) inducida por un régimen alimenticio enriquecido en colesterol al 2%

<i>S. boulardii</i>	Colesterol 2%	n	Día 3	Día 0	Día 4	Día 7	Día 11	Día 14	Día 18	Día 21	Día 25
-	-	10	107,3 ±2,9	97,6 ±3,4	95,9 ±3,0	90,0 ±3,4	83,1 ±2,5	86,0 ±2,7	76,3 ±2,7	72,3 ±2,7	70,4 ±2,9
+	-	9	105,6 ±2,5	98,0 ±1,7	96,7 ±2,6	92,1 ±3,1	81,9 ±3,4	81,5 ±2,8	71,6 ±4,2	73,7 ±3,3	72,8 ±3,0
-	+	8	109,9 ±2,2	97,3 ±2,8	142,3 ±6,4 *	127,6 ±5,1 *	123,5 ±5,1 *	120,6 ±5,3 *	115,2 ±4,3 *	110,3 ±7,1 *	113,5 ±6,8 *
+	+	9	106,6 ±3,1	97,6 ±3,5	131,1 ±3,0 *	120,1 ±2,5 *	109,6 ±4,5 *#	103,4 ±3,0 *#	97,2 ±3,1 *#	97,5 ±3,1 *#	94,7 ±3,5 *#

El régimen enriquecido en colesterol y el *S. boulardii* se dan a partir del Día 0 y Día 4 respectivamente.  
 \*: p <0,05, prueba estadística ANOVA con medidas repetidas de los grupos tratados comparados con el grupo testigo  
 #: p <0,05 para el grupo de *S. boulardii* + colesterol comparado con el grupo de colesterol solo.

El régimen enriquecido en colesterol causa un aumento significativo de la colesterolemia desde la primera valoración realizada el día 4 con un nivel de colesterol de 142,3 mg/dl, es decir un aumento del 48% de la colesterolemia sérica con respecto a la del grupo testigo (95,9 mg/dl).

5 A partir del día 11 y hasta el final del estudio, la colesterolemia del grupo de *S. boulardii* + colesterol disminuye significativamente con respecto al grupo de colesterol.

Por otra parte, se observa un aumento significativo del 20% en el peso medio de los hígados del grupo de colesterol (16,2 ± 0,6 g) con respecto al grupo testigo (13,5 ± 0,4 g). El *S. boulardii* no tiene efecto propio (13,0 ± 0,4 g). En cambio, para el grupo de *S. boulardii* + colesterol, el peso del hígado (14,9 ± 0,3 g) no se aumenta más que en un 10%, y de manera no significativa.

10 En conclusión, el *S. boulardii* limita de manera significativa la hipercolesterolemia y la hepatomegalia inducidas por un régimen alimenticio enriquecido en colesterol en la rata.

#### Ejemplo 2

15 En este ejemplo, los resultados obtenidos en la rata han sido confirmados en el hámster, otro modelo animal reconocido para el estudio de la hipercolesterolemia (Bhathena et al. (2009) J. Med Food 12: 310-319; Chiu et al. (2006) Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 238-245).

#### 1. Materiales y métodos

##### 1.1. Animales

20 Se utilizan hámsteres sirios dorados machos (Janvier), con un peso comprendido entre 70 y 80 gramos al principio de los estudios, después de su aclimatación durante al menos 7 días en el animalario ( $t^{\circ} = 22 \pm 2$  °C; alimentación SAFE "105"; ritmo circadiano 12 h/12 h).

##### 1.2. Protocolo

##### 1.2.1. Régimen alimenticio enriquecido en colesterol

25 Diferentes lotes de régimen "105" enriquecido en colesterol al 0,1-0,25-0,5-1% fueron preparados por SAFE. Los hámsteres se ponen 5 por jaula al principio del experimento. El *Saccharomyces boulardii* Biocodex se administra por vía oral.

##### 1.2.2. Extracciones de sangre y de hígado

Los hámsteres se mantienen en ayunas la víspera de las extracciones.

Al final del experimento, se extrae sangre por punción cardiaca, bajo anestesia con isoflurano. A continuación, se extrae el hígado, después se congela a -80 °C para análisis posteriores.

30 La sangre se vierte en un tubo Sarstedt Multivette de 600 µl que contiene un activador de la coagulación (ref. 15.1670). El tubo se centrifuga a 10000 g (14000 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente en la centrífuga *Centrifuge 5415C* Eppendorf. Se recupera el suero en varios micro-tubos Sarstedt de 0,5 ml (ref. 72.699), que se ponen en un congelador a -80 °C antes del análisis.

##### 1.2.3. Valoración del colesterol sérico por colorimetría

35 Se prepara una solución madre de colesterol (Sigma, ref. C3045) a 3 g/l disolviendo 30 mg de colesterol en 10 ml de una solución de desoxicolato de sodio a 150 g/l a 40 °C durante 60 min como mínimo. La solución de desoxicolato de sodio se obtiene por disolución de 15 g de desoxicolato de sodio en 100 ml de NaCl al 0,9% agitando después a 40 °C durante 60 min como mínimo.

40 Se prepara una escala de patrones por diluciones sucesivas en la solución de desoxicolato de sodio a partir de la solución madre para obtener concentraciones de 0,375; 0,75; 1,5 y 3 g/l de colesterol.

Se mezclan 10 µl de la muestra o del patrón con 1000 µl de reactivo destinado a medir el colesterol total (Menarini, ref. 30990). 30 min después, se realiza la medida de la absorbancia con respecto a un blanco de reactivo a una temperatura de 37 °C a una longitud de onda de 510 nm, en un espectrofotómetro SPEDCOR 2005 con cubetas que tienen un camino óptico de 1 cm (Spectrovettes Evergreen, Dutscher, ref. 064005).

45 Los controles se realizan con el kit multicalibrador (Menarini ref. 37484), el kit de control bajo (ref. 37492) y el kit de control alto (ref. 37493).

##### 1.2.4. Valoración del colesterol hepático por colorimetría

5 Se adapta el protocolo de Loison et al. (2002) *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 101-14. Se descongela 1 g de hígado y después se tritura y se homogeniza en 5 ml de isopropanol (tubo Sarstedt de 50 ml) utilizando un molino Ultra-Turax. Se incuba el triturado a 60 °C durante 1 hora con agitación (250 rpm, NBS incubador agitador C24) y después se centrifuga a 3000 g durante 5 min a 4 °C (Beckmann Allegra 21R rotor c0650). Se recupera el sobrenadante (sobrenadante 1) y se recoge el sedimento en 5 ml de isopropanol y después se centrifuga (3000 g, 5 min, a 4 °C). El sobrenadante obtenido (sobrenadante 2) se mezcla con el sobrenadante 1, y después se centrifuga de nuevo. Se conservan alícuotas de 1,7 ml del sobrenadante obtenido de este modo en el congelador a -80 °C antes del análisis, si es necesario.

10 Se analizan 10 µl de la mezcla de los 2 sobrenadantes del extracto de hígado como se ha indicado anteriormente para el colesterol sérico total.

#### 1.2.5. Valoración del colesterol HDL sérico

15 El ensayo consiste en dos etapas de reacción distintas con ayuda del kit de colesterol HDL de Menarini ref. 37459. Hay ante todo una eliminación de los quilomicrones, del colesterol VLDL y del colesterol LDL por la acción de una colesterol esterasa, una colesterol oxidasa y una catalasa (reactivo R1), después una medida específica de colesterol HDL tras la liberación del colesterol HDL por los detergentes contenidos en el reactivo R2. La intensidad del colorante "quinona-imina" es directamente proporcional a la concentración de colesterol medida a 600 nm.

Para la realización de una curva patrón, se preparan diluciones sucesivas de una solución madre que contiene colesterol HDL 3,66 mM (es decir, 141,2 mg/dl) (kit de calibración de HDL Menarini, ref. 37485) en agua destilada para obtener concentraciones de 4,41 - 8,82 - 17,6 - 35,3 - 70,6 - 141,2 mg/dl.

20 Para las medidas, se mezclan 575 µl de reactivo R1 con 10 µl de patrón o de muestra (previamente diluido a la mitad) en una cubeta, después se deja incubar 5 minutos con agitación. Se añaden entonces 175 µl de reactivo R2 y se agita durante 5 minutos antes de medir la absorbancia frente a un blanco de reactivo. La temperatura de trabajo es de 37 °C y la absorbancia se mide a una longitud de onda de 600 nm y con cubetas de espectrofotómetro de un camino óptico de 1 cm (Spectrovettes Evergreen semi-micro de precisión de un solo uso, ref. 064005).

#### 25 1.2.6. Valoración de los triglicéridos séricos

La determinación de los triglicéridos se hace después de la separación enzimática del glicerol con la lipoproteína-lipasa. El producto coloreado es una quinona-imina que se mide a 510 nm y que es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra.

30 Para la realización de una curva patrón, se realizan diluciones sucesivas de una solución madre de glicerol a 2,5 mg/ml en agua destilada para obtener concentraciones de 0, 31,25, 62,5, 125 y 250 mg/dl.

35 Las medidas se realizan utilizando el kit de triglicéridos de Menarini (ref. 37481) mezclando 10 µl de muestra o de patrón con 1000 µl de reactivo Menarini. La absorbancia se determina después de 30 min con respecto a un blanco de reactivo. La temperatura de trabajo es de 20-25 °C y la absorbancia se mide a una longitud de onda de 510 nm y con cubetas de espectrofotómetro de un camino óptico de 1 cm (Spectrovettes Evergreen semi-micro de alta precisión de un solo uso, ref. 064005).

#### 1.3. Productos

El *Saccharomyces boulardii* liofilizado (Ultralevure® lote 4325, Biocodex) se conserva entre 4 y 6 °C, se disuelve en agua destilada.

El colesterol (Sigma, ref. C3045) se almacena a -20 °C. El desoxicolato de sodio se obtiene de Fluka (ref. 30970).

40 El isopropanol se obtiene de VWR (ref. 20880.290).

El glicerol (5 ml, a 2,5 mg/ml) se obtiene de Sigma (ref. G7793) y se almacena a 2-8 °C.

Los kits de valoración de Menarini (Reactivo de medida del colesterol total, ref. 30990; kit de colesterol, ref. 90132; kit de triglicéridos, ref. 37481; kit de colesterol HDL, ref. 37459; kit multicalibrador, ref. 37484; kit de control bajo ref. 37492; kit de control alto, ref. 34493; reactivo de LDL/HDL, ref. 37485) se mantienen entre 4 y 6 °C.

#### 45 1.4. Análisis estadístico

50 Los resultados se expresan como la media ± SEM. La prueba estadística utilizada es un análisis de varianza de un factor o dos factores, salvo para el parámetro de los pesos corporales. Cuando el resultado no depende del azar (5%) se determinan los grupos tratados que difieren del grupo testigo con ayuda del test de Student Newman-Keuls o de Bonferoni y del software Sigma Stat (versión 3.1). Para los pesos corporales, la prueba estadística utilizada es un análisis de varianza con medidas repetidas.

#### 2. Resultados

## 2.1. Estudio Nº 1

En este primer estudio (n = 5 por grupo), se ha administrado un régimen enriquecido en colesterol al 0,1-0,5-1% durante 14 o 28 días para medir el efecto de cada uno de estos 3 regímenes sobre la colesterolemia en el hámster.

5 No se constata ninguna modificación significativa inducida por los 3 regímenes enriquecidos con respecto al grupo testigo en lo que concierne a la evolución de los pesos corporales.

La colesterolemia basal se sitúa en  $144 \pm 10$  mg/dl al principio del estudio (día 0). En los dos grupos testigos, la colesterolemia disminuye ligeramente a  $137 \pm 6$  mg/dl el día 14 y a  $125 \pm 11$  mg/dl el día 28, pero no significativamente.

10 El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento del 36% de la colesterolemia medida el día 14 a  $186 \pm 4$  mg/dl y un aumento significativo del 65% el día 28 ( $206 \pm 9$  mg/dl). A concentraciones superiores a 0,5 y 1% de colesterol en el régimen, se observa un aumento todavía más fuerte de la colesterolemia.

Además, el régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del colesterol hepático. Se observa un aumento de colesterol hepático todavía más fuerte para los regímenes enriquecidos con concentraciones de 0,5 y 1% de colesterol.

15 Este primer estudio demuestra que un régimen enriquecido a partir de 0,1% de colesterol permite obtener una hipercolesterolemia significativa en el hámster.

## 2.2. Estudio Nº 2

En este estudio (n = 10 por grupo), se ha administrado un régimen enriquecido en colesterol al 0,1% (SAFE) durante 14 días para medir el efecto de *Saccharomyces boulardii* Biocodex a  $2 \times 3$  g/kg/día sobre la hipercolesterolemia.

20 No se constata ninguna modificación significativa del peso corporal inducida por el régimen enriquecido y/o por el *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día con respecto al grupo testigo.

25 La colesterolemia del grupo testigo es de  $138 \pm 3$  mg/dl (Tabla 2). El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del 55% en la colesterolemia medida el día 14 ( $214 \pm 11$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día no modifica la colesterolemia basal ( $134 \pm 3$  mg/dl), pero la levadura limita el aumento de la colesterolemia del grupo que recibe el régimen enriquecido a solamente el 33% ( $184 \pm 3$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex disminuye por lo tanto significativamente en un 14% el aumento de la colesterolemia inducida por régimen enriquecido en colesterol al 0,1%.

30 Asimismo, el régimen enriquecido aumenta significativamente el colesterol hepático en 387%:  $3,22 \pm 0,09$  mg de colesterol por gramo de hígado en el grupo testigo y  $15,67 \pm 0,78$  mg/g en el grupo que recibe el régimen enriquecido. El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día no modifica el colesterol hepático basal ( $2,76 \pm 0,13$  mg/g), pero la levadura limita el aumento del colesterol hepático del grupo que recibe el régimen enriquecido a solamente 261% ( $11,62 \pm 0,79$  mg/g). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex, disminuye por lo tanto significativamente en un 26% el aumento del colesterol hepático inducido por el régimen enriquecido en colesterol al 0,1%.

## 35 2.3. Estudio Nº 3

En este estudio (n = 10), se ha reproducido el mismo protocolo que para el estudio precedente, utilizando una dosis inferior de *Saccharomyces boulardii* Biocodex a  $2 \times 1$  g/kg/día.

No se constata ninguna modificación significativa en el peso corporal inducida por el régimen enriquecido y/o por el *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 1$  g/kg/día con respecto al grupo testigo.

## 40 Valoración del colesterol

45 La colesterolemia del grupo testigo es de  $132 \pm 5$  mg/dl (Tabla 2). El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del 52% en la colesterolemia sérica medida el día 14 ( $200 \pm 10$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 1$  g/kg/día no modifica la colesterolemia basal ( $129 \pm 6$  mg/dl), pero la levadura limita el aumento de la colesterolemia del grupo que recibe el régimen enriquecido a solamente el 34% ( $176 \pm 4$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex disminuye significativamente en un 12% el aumento de la colesterolemia inducida por el régimen enriquecido en colesterol al 0,1%.

## Valoración del colesterol HDL

50 La concentración sérica de colesterol HDL del grupo testigo es de  $76,3 \pm 1,8$  mg/dl (Tabla 2). El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del 34% en el colesterol HDL medido el día 14 ( $102,2 \pm 6,1$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 1$  g/kg/día no modifica la concentración basal de colesterol HDL ( $72,7 \pm 2,4$  mg/dl), pero la levadura limita el aumento del colesterol HDL del grupo que recibe el

régimen enriquecido en solamente el 18% ( $90,4 \pm 3,1$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex, disminuye por lo tanto significativamente el aumento del colesterol HDL inducido por el régimen enriquecido en colesterol al 0,1%.

Cálculo del colesterol VLDL + LDL

5 El colesterol en la forma no HDL, es decir, el colesterol bajo la forma VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) y LDL ha sido calculado según la fórmula:

$$\text{Colesterol no HDL} = \text{Colesterol total} - \text{colesterol HDL}$$

10 La concentración sérica de colesterol VLDL + LDL del grupo testigo es de  $55,3 \pm 3,5$  mg/dl. El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del 75% del colesterol VLDL+ LDL sérico medido el día 14 ( $96,6 \pm 5,5$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 1$  g/kg/día no modifica la concentración basal de colesterol VLDL + LDL ( $56,5 \pm 4,5$  mg/dl), pero la levadura limita el aumento del colesterol VLDL + LDL del grupo que recibe el régimen enriquecido en solamente el 55% ( $85,7 \pm 3,0$  mg/dl).

Valoración de los triglicéridos

15 La concentración sérica de triglicéridos del grupo testigo es de  $214 \pm 33$  mg/dl (Tabla 2). El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del 82% en los triglicéridos séricos medidos el día 14 ( $389 \pm 75$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 1$  g/kg/día no modifica la concentración basal de triglicéridos ( $222 \pm 28$  mg/dl), pero la levadura bloquea completamente el aumento de los triglicéridos séricos del grupo que recibe el régimen enriquecido ( $251 \pm 32$  mg/dl).

2.4. Estudio Nº 4

20 En este estudio ( $n = 10$ ), se ha administrado *Saccharomyces boulardii* Biocodex a  $2 \times 3$  g/kg/día a partir del día 14 desde el principio del régimen enriquecido en colesterol al 0,1%, y durante 14 días, para estudiar el efecto de la levadura sobre la hipercolesterolemia ya establecida.

No se constata ninguna modificación significativa del peso corporal inducida por el régimen enriquecido y/o por el *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día con respecto al grupo testigo.

Valoración del colesterol

25 La colesterolemia del grupo testigo es de  $111 \pm 3$  mg/dl (Tabla 2). El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un incremento significativo de 108% de la colesterolemia medida el día 28 ( $231 \pm 10$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día a partir del día 14 no modifica la colesterolemia basal ( $116 \pm 4$  mg/dl), pero la levadura limita el aumento de la colesterolemia del grupo que recibe el régimen enriquecido a solamente un 82% ( $203 \pm 5$  mg/dl). Cuando la hipercolesterolemia está establecida, el *Saccharomyces*  
30 *boulardii* Biocodex es entonces capaz de disminuir significativamente en un 12% el aumento de la colesterolemia inducida por el régimen enriquecido en colesterol al 0,1% después de 14 días.

Valoración del colesterol HDL

35 La concentración sérica de colesterol HDL del grupo testigo es de  $73,3 \pm 2,1$  mg/dl (Tabla 2). El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del 61% del colesterol HDL sérico medido el día 28 ( $118,0 \pm 3,2$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día a partir del día 14 no modifica la concentración basal de colesterol HDL ( $77,0 \pm 2,5$  mg/dl), pero la levadura limita el aumento del colesterol HDL del grupo que recibe el régimen enriquecido a solamente el 43% ( $105,0 \pm 2,6$  mg/dl). Cuando la hipercolesterolemia está establecida, el *Saccharomyces boulardii* es entonces capaz de disminuir significativamente en un 11% el aumento del colesterol HDL inducido por el régimen enriquecido en colesterol al 0,1% después de 14 días.

40 Cálculo del colesterol VLDL + LDL

45 La concentración sérica de colesterol VLDL + LDL del grupo testigo es de  $38,0 \pm 3,0$  mg/dl. El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo del 189% del colesterol VLDL + LDL sérico medido el día 28 ( $110,0 \pm 7,7$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día no modifica la concentración basal de colesterol VLDL + LDL ( $38,9 \pm 2,9$  mg/dl), pero la levadura limita el aumento del colesterol VLDL + LDL del grupo que recibe el régimen enriquecido a solamente el 158% ( $98,0 \pm 3,8$  mg/dl).

Valoración de los triglicéridos

50 La concentración sérica de triglicéridos del grupo testigo es de  $151 \pm 31$  mg/dl (Tabla 2). El régimen enriquecido con 0,1% de colesterol causa un aumento significativo de 130% en los triglicéridos séricos medidos el día 28 ( $348 \pm 66$  mg/dl). El *Saccharomyces boulardii* Biocodex administrado a  $2 \times 3$  g/kg/día a partir del día 14 cuando la hipercolesterolemia está presente, no modifica la concentración basal de triglicéridos ( $132 \pm 20$  mg/dl), pero la levadura bloquea completamente el aumento de los triglicéridos séricos del grupo que recibe el régimen enriquecido ( $212 \pm 25$  mg/dl).

5 En conclusión, la administración de *Saccharomyces boulardii* Biocodex en el momento de la instalación de una hipercolesterolemia, o cuando está instalada una hipercolesterolemia, causa una reducción significativa de la hipercolesterolemia inducida por un régimen alimenticio enriquecido en colesterol en el hámster. El *Saccharomyces boulardii* Biocodex permite también oponerse de manera significativa al aumento de la concentración de triglicéridos séricos inducido por el régimen alimenticio enriquecido en colesterol en el hámster.

Tabla 2: Resumen de los efectos de *Saccharomyces boulardii* Biocodex sobre los parámetros de la colesterolemia y de la trigliceridemia modificados por un régimen enriquecido con 0,1% de colesterol en el hámster.

Régimen enriquecido en colesterol	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Colesterolemia (mg/dl)	% var	Colesterol HDL (mg/dl)	% var	Triglicéridos (mg/dl)	% var
<u>De día 0 a día 14</u>	<u>De día 0 a día 14</u>						
-	-	138 ± 3					
0,1%	-	214 ± 11*	+ 55				
0	2 x 3 g/kg/día	134 ± 3	+ 3				
0,1%	2 x 3 g/kg/día	184 ± 3* @	+ 33				
<u>De día 0 a día 14</u>	<u>De día 0 a día 14</u>						
-	-	132 ± 5		76,3 ± 1,8		214 ± 33	
0,1%	-	200 ± 10 *	+ 52	102,2 ± 6,1*	+ 34	389 ± 75*	+ 82
0	2 x 1 g/kg/día	129 ± 6	- 2	72,7 ± 2,4	- 5	222 ± 28	+ 4
0,1%	2 x 1 g/kg/día	176 ± 4 * @	+ 34	90,4 ± 3,1* @	+ 18	251 ± 32 @	+ 17
<u>De día 0 a día 28</u>	<u>De día 14 a día 28</u>						
-	-	111 ± 3		73,3 ± 2,1		151 ± 31	
0,1%	-	231 ± 10*	+ 108	118,0 ± 3,2*	+ 61	348 ± 66*	+ 130
0	2 x 3 g/kg/día	116 ± 4	+ 4	77,0 ± 2,5	+ 5	132 ± 20	- 13
0,1%	2 x 3 g/kg/día	203 ± 5* @	+ 82	105,0 ± 2,6* @	+ 43	212 ± 25 @	+ 40

(\*: prueba estadística ANOVA de 2 factores de los grupos tratados en comparación con los grupos testigos respectivos;  
 @: prueba estadística ANOVA de 2 factores de los grupos que reciben *S. boulardii* Biocodex y el régimen enriquecido en comparación con los grupos respectivos que reciben solamente el régimen enriquecido),  
 (% var: porcentaje de variación con respecto al grupo testigo sin tratamiento)

**REIVINDICACIONES**

1. Células de la levadura *Saccharomyces boulardii* para su utilización en la reducción de la colesterolemia y/o de la trigliceridemia en un individuo que presenta factores de riesgo cardiovascular o en la prevención o el tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia en un individuo.
- 5 2. Células de la levadura *Saccharomyces boulardii* para su utilización según la reivindicación 1, estando liofilizadas las células de levadura.
3. Células de la levadura *Saccharomyces boulardii* para su utilización según la reivindicación 1 o 2, siendo administradas las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* en forma de cápsulas o de sobres.
- 10 4. Células de la levadura *Saccharomyces boulardii* para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, siendo administradas las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* a una dosis de 0,00125 a 25 g/kg/día.
5. Composición farmacéutica que comprende como sustancias activas:
  - células de la levadura *Saccharomyces boulardii*, y
  - al menos un compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia seleccionado del grupo constituido por una estatina, un fibrato y un fitosterol,
- 15 eventualmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende una dosis de 50 a 250 mg de células de levadura de la especie *Saccharomyces boulardii* en forma liofilizada.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 6, para reducir la colesterolemia y/o la trigliceridemia en un individuo.
- 20 8. Composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 5 a 7, para su utilización en el tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia.
9. Productos que contienen:
  - células de la levadura *Saccharomyces boulardii*, y
  - al menos un compuesto adicional destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia,
- 25 como un producto de combinación para una utilización simultánea, separada o escalonada en el tiempo para la reducción de la colesterolemia y/o de la trigliceridemia en un individuo que presenta factores de riesgo cardiovascular o para el tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia en un individuo.
- 30 10. Productos para utilización según la reivindicación 9, en los cuales el compuesto destinado al tratamiento de la hipercolesterolemia y/o de la hipertrigliceridemia se selecciona del grupo constituido por una estatina, un fibrato, niacina, y un fitosterol.
11. Productos para utilización según la reivindicación 9 o 10, en los que las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* están liofilizadas.
- 35 12. Productos para utilización según una de las reivindicaciones 9 a 11, en los que las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* se administran a una dosis de 0,00125 a 25 g/kg/día.

