

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 926**

51 Int. Cl.:

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61K 36/31** (2006.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

**A23L 33/105** (2006.01)

**A23L 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.1999 PCT/JP1999/01354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.1999 WO99047006**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.1999 E 99909229 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 1064855**

54 Título: **Alimentos relacionados con la reducción del nivel de colesterol humano**

30 Prioridad:

**19.03.1998 JP 7051098**

**19.03.1998 JP 7066498**

**04.12.1998 JP 34600198**

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

**20.11.2017**

73 Titular/es:

**SUNSTAR INC. (100.0%)**

**3-1, Asahimachi Takatsuki-shi**

**Osaka 569-1195, JP**

72 Inventor/es:

**SUIDO, HIROHISA;**

**IKEDA, AKO;**

**TABEI, TOSHIO;**

**KOTANI, MAYUMI;**

**FUJITA, AKIHITO y**

**TAKEUCHI, AKIRA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 642 926 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

Alimentos relacionados con la reducción del nivel de colesterol humano

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a alimentos que contienen brócoli y col para la utilización en la reducción de los niveles de colesterol sérico humano.

10 **Antecedentes de la técnica**

Algunos estudios recientes han revelado que la flora intestinal presenta diversas funciones, tales como la formación o la inactivación de sustancias carcinógenas o sustancias aceleradoras de la senilidad y la activación o toxificación de fármacos, en los intestinos. En la flora intestinal, es conocido que las bifidobacterias presentan funciones tales como la protección del cuerpo frente a la infección entérica y el envenenamiento alimenticio causado por bacterias patógenas, la supresión de la putrefacción intestinal para reducir de esta manera las actividades enzimáticas relacionadas con la carcinogénesis y la formación de productos de putrefacción, la prevención del estreñimiento mediante la estimulación de la motilidad intestinal, la mejora de la función inmunitaria del huésped mediante estimulación, la descomposición o adsorción de sustancias carcinogénicas y la producción del grupo de vitaminas B (J. Antibact. Antifung. Agents vol. 25, nº 4, páginas 219 a 231, 1997). Se han realizado intentos para mantener el predominio de las bifidobacterias que presentan estas funciones en los intestinos, mediante la administración en el ser humano de materiales estimuladores de la proliferación de *Bifidobacterium*, solos o como alimentos o fármacos que contienen dichos materiales.

Entre los materiales estimuladores conocidos de la proliferación de *Bifidobacterium* se incluyen sacáridos, tales como N-acetilglucosamina, lactulosa, rafinosa, estaquiosa, maltotriosa ("Bifidobacteria", página 77, 1979, Yakult Honsha Co., Ltd.), fructooligosacárido ("Kagaku to Seibutsu Chemistry and Organism", vol. 21, página 291, 1983, Gakkai Shuppan Center), galactooligosacárido (publicaciones de patente japonesa examinada nº 1983-20266 y nº 1986-46479 y publicación de patente japonesa no examinada nº 1985-41449), isomaltooligosacárido (Japan Nutritional Science Society, 1986), teanderosa (publicación de patente japonesa no examinada nº 1991-183454), ciclodextrina (publicación de patente japonesa no examinada nº 1982-138385) y manano konjac ("Riken Intestinal Flora Symposium, Intestinal Flora and Nutrition, página 89, 1983, Gakkai Shuppan Center), extracto de zanahoria (que comprende panteteína como componente principal; "Bifidobacteria", página 77, 1979, Yakult Honsha Co., Ltd.), leche de soja (publicación de patente japonesa examinada nº 1970-9822), extracto de leche de soja (publicación de patente japonesa no examinada nº 1984-17906), extracto de solución de cultivo de *Escherichia coli* no patogénica (publicación de patente japonesa examinada nº 1975-13359), un producto de descomposición enzimática de material que contiene proteína de cebada (publicación de patente japonesa no examinada nº 1986-282070), calabaza en polvo (publicación de patente japonesa no examinada nº 1988-291579), extracto alcohólico de residuo tras la extracción de los componentes solubles en aceite de las habas de la soja (publicaciones de patente japonesa no examinada nº 1987-155082 y nº 1985-66978), jarabe extraído del fruto de la calabaza (publicación de patente japonesa no examinada nº 1990-135088), extracto de té (publicación de patente japonesa no examinada nº 1989-191680), extracto vegetal de la familia *Araliaceae* (publicación de patente japonesa no examinada nº 1990-249482), un producto de patata seco (publicación de patente japonesa no examinada nº 1994-217733), extracto de hojas de *Coffea* L. (publicación de patente japonesa no examinada nº 1994-125771), col china (publicación de patente japonesa no examinada nº 1990-242667) y fruto cítrico (publicación de patente japonesa no examinada nº 1990-273155).

Muchos de los materiales estimuladores de la proliferación de *Bifidobacterium* conocidos muestran un efecto reducido en la práctica o presentan una baja selectividad para enterobacterias de manera que son utilizadas por bacterias dañinas diferentes de las bifidobacterias para producir de esta manera gases tóxicos. Además, algunos de los materiales conocidos exigen una complicada manipulación para la producción o resultan caros. Por lo tanto, los materiales estimuladores de la proliferación de *Bifidobacterium* conocidos no resultan satisfactorios en todos los aspectos.

Además, en los últimos años un creciente número de personas de media a avanzada edad y de niños sufre de enfermedades inducidas por el estilo de vida, tales como el infarto de miocardio y la arterioesclerosis. Uno de los principales factores de riesgo del infarto de miocardio y la arterioesclerosis es la hipercolesterolemia.

La hipercolesterolemia habitualmente se trata mediante la administración de una medicina, en combinación con diversos tipos de restricciones en la dieta. Sin embargo, la medicina utilizada predominantemente para el tratamiento de la hipercolesterolemia, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa para la inhibición de la acción enzimática en la ruta de síntesis del colesterol en el cuerpo, produce efectos secundarios tales como rabdomiolisis y deterioro funcional hepático y fenómenos de rebote. También se conoce una medicina que utiliza una resina de intercambio iónico para la adsorción, en los intestinos, de los ácidos biliares que presentan un contenido elevado de colesterol y la descarga del colesterol fuera del cuerpo. Sin embargo, la medicina debe ingerirse en una cantidad elevada y presenta un sabor desagradable. Además, las restricciones en la dieta

prolongadas resultan indeseables ya que el paciente se ve forzado a soportar comidas desagradables.

Por lo tanto, resultaría ideal que el nivel sérico de colesterol pudiese rebajarse manteniendo simultáneamente una dieta ordinaria, sin restricciones en la dieta o la administración de medicinas con efectos secundarios tales como rabdomiolisis y deterioro funcional hepático.

A partir de lo expuesto anteriormente, se han realizado diversos estudios sobre alimentos funcionales que resultan eficaces para reducir el nivel sérico del colesterol en el ser humano y para mejorar el metabolismo de los lípidos.

El documento EP 0 462 021 A y K. Ebihara *et al.*: "Cholesterol-lowering activity of various dietary fibers and their taurocholate-binding capacity *in vitro*", nº de acceso de base de datos 1979:53579, y Nippon Nogei Kagaku Kaishi, vol. 52, nº 9, 1978, páginas 401 a 408 dan a conocer la utilización de un extracto o fibras alimentarias procedentes del rábano japonés como agente reductor del nivel de colesterol.

I. Jahodar *et al.*: "A study on the antihypercholesterolemic and antihyperlipidemic effects of cabbage extracts and their phytochemical evaluation", nº de acceso de base de datos 1994:1007353 y Pharmazie, vol. 50, nº 12, 1995, páginas 833 a 834 y T. Kiribuchi *et al.*: "Hypocholesterolemic effect of cabbage sterols (I) on plasma and liver cholesterol levels in rats", nº de acceso de base de datos 1974:131951 y Eiyō to shokuryō, vol. 26, nº 8, 1973, páginas 491 a 495 dan a conocer la utilización de extractos de col como agentes reductores del nivel de colesterol.

Hoagland P.D.: "Binding of Dietary Anions to Vegetable Fiber", Journal of Agricultural and Food Chemistry, American Chemical Society, US LNKD-DOI:10.1021/ JF00089A030, vol. 37, nº 5, 1 de septiembre de 1989 (1989-09-01), páginas 1343 a 1347, da a conocer que el quenodesoxicolato y el decanoato se unen al residuo insoluble en alcohol de la zanahoria, la col, el brócoli y la cebolla. El documento sugiere además que dicha unión podría resultar beneficiosa al reducir los niveles de colesterol en sangre.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 2 es un gráfico que representa el efecto estimulador de la proliferación de *Bifidobacterium* mediante la utilización combinada de verduras específicas.

La figura 3 es un gráfico que representa el cambio en el nivel de IgE en suero de ratón con el tiempo.

#### Divulgación de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente estimulador de la proliferación de *Bifidobacterium* que contiene un material estimulador de la proliferación de *Bifidobacterium* que se encuentra libre de las desventajas anteriormente indicadas, presenta una elevada actividad de proliferación de *Bifidobacterium*, puede ser producido con facilidad a bajo coste y es altamente seguro desde el punto de vista de la higiene alimentaria y un alimento y material alimenticio que posee una acción estimuladora de la proliferación de *Bifidobacterium*. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para hacer proliferar un *Bifidobacterium*.

En el contexto de la presente invención se ha realizado una exhaustiva investigación para desarrollar, a partir de diversos productos naturales, materiales con una elevada actividad estimuladora de la proliferación de *Bifidobacterium*. Como resultado, se ha descubierto que algunas verduras y frutas, tales como brócoli, col, espinacas, komatsuna (*Brassica rapa* L.), takana (*Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *integrifolia* Sinsk.), karashina (*Brassica juncea* Czern. et Coss.), coliflor y col rizada.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un alimento con una acción de reducción del nivel de colesterol en el suero humano y un agente preventivo o terapéutico para la hipercolesterolemia o la arterioesclerosis en el ser humano sin efectos secundarios, tales como el deterioro funcional hepático, encontrándose el alimento y el agente libres de las desventajas anteriormente indicadas.

En el contexto de la presente invención se somete a ensayo un zumo de verduras mixto comercializado por su compañía, a fin de evaluar su acción de reducción del nivel de colesterol, mediante la administración en ratas. Sin embargo, una acción de este tipo no pudo ser demostrada. Por lo tanto, se entendió que el zumo de verduras no presentaba ninguna acción de reducción del nivel del colesterol sérico.

Sin embargo, en un examen médico rutinario y posterior revisión detallada realizada en la compañía de los inventores, se observó que un gran número de miembros del personal presentaban un nivel de colesterol sérico notablemente reducido. La investigación sobre estos miembros del personal reveló que no habían bebido regularmente el zumo de verduras antes del examen rutinario pero que habían empezado a beberlo después de la revisión rutinaria, aproximadamente una lata al día del zumo comercializado en la compañía. En consecuencia, se encontró inesperadamente que el zumo de verduras presentaba una acción de reducción del nivel de

colesterol sérico en el ser humano.

En el contexto de la presente invención se realiza una investigación exhaustiva respecto al efecto del zumo de verduras mixto sobre el colesterol sérico en el ser humano con el fin de identificar qué ingrediente mostraba la acción. Además, sometieron a ensayo extensivamente otras plantas comestibles para la acción y encontraron que el brócoli, la bolsa de pastor y otras plantas comestibles, en particular, los componentes funcionales en las fracciones solubles en agua de las plantas comestibles, presentaban una actividad inhibidora de la síntesis del colesterol en hepatocitos humanos y una buena acción de reducción del nivel sérico de colesterol y una buena acción reductora del nivel de lipoproteína-colesterol de baja densidad (LDL-Col). Además, se encontró inesperadamente que la utilización combinada de col, coles de Bruselas, rábano japonés u hojas de rábano japonés con las plantas comestibles anteriormente indicadas con actividad inhibidora de la síntesis de colesterol en hepatocitos humanos incrementaba específicamente la actividad inhibidora de la síntesis de colesterol en hepatocitos humanos, alcanzando de esta manera una acción más elevada de reducción del nivel de colesterol sérico en el ser humano y una acción más elevada de reducción del nivel de lipoproteína de baja densidad-colesterol (LDL-Col) en el ser humano. Además, en el contexto de la presente invención se descubre que una medicina que contenía las plantas comestibles anteriormente indicadas resulta utilizable como agente preventivo o terapéutico para la hipercolesterolemia humana o como agente preventivo o terapéutico para la arteriosclerosis humana, en ambos casos sin efectos secundarios tales como el deterioro funcional hepático. La presente invención se ha llevado a cabo basándose en los resultados anteriormente indicados.

La presente invención proporciona los alimentos siguientes:

[1] Un alimento según las reivindicaciones 1 a 9 que contiene brócoli y col y opcionalmente elementos seleccionados de entre el grupo que consiste en coliflor, col rizada, bolsa de pastor, *suzushiro* (*Arabis flagellosa* Miq.), *hatazao* (*Arabis glabra*), *tagarashi* (*Cardamine flexuosa*), hierba pastel, *oobatanetsukebana* (*Cardamine scutata*), *yamagarashi* (*Barbarea vulgaris* R.Br. var. *stricta* Regel), berro, *takana* (*Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *integrifolia* Sinsk.), *karashina* (*Brassica juncea* Czern. et Coss.), rábano picante japonés, yuriwasabi (*Wasabia tenuis*), *hinona* (*Brassica campestris* var. *akana*), *sugukina* (*Brassica campestris* var. *neosuguki*), nabo, colza, espinacas, *komatsuna* (*Brassica rapa* L.), apio, perejil, lechuga, manzana, col china, coles de Bruselas, rábano japonés y hojas de rábano japonés.

[1-A] Alimento según el ítem [1] que presenta una acción de reducción del nivel sérico de colesterol en el ser humano.

Los alimentos de la presente invención se describen a continuación con mayor detalle.

El alimento de la presente invención contiene brócoli y col y elementos seleccionados de entre el grupo que consiste en coliflor, col rizada, bolsa de pastor, *suzushiro* (*Arabis flagellosa* Miq.), *hatazao* (*Arabis glabra*), *tagarashi* (*Cardamine flexuosa*), hierba pastel, *oobatanetsukebana* (*Cardamine scutata*), *yamagarashi* (*Barbarea vulgaris* R.Br. var. *stricta* Regel), berro, *takana* (*Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *integrifolia* Sinsk.), *karashina* (*Brassica juncea* Czern. et Coss.), rábano picante japonés, yuriwasabi (*Wasabia tenuis*), *hinona* (*Brassica campestris* var. *akana*), *sugukina* (*Brassica campestris* var. *neosuguki*), nabo, colza, espinacas, *komatsuna* (*Brassica rapa* L.), apio, perejil, lechuga, manzana, col china, coles de Bruselas, rábano japonés y hojas de rábano japonés. Estas verduras o frutas se utilizan en combinación, según las reivindicaciones 1 a 9.

Las verduras y frutas mencionadas anteriormente presentan una acción reductora del nivel sérico de colesterol en el ser humano. Por lo tanto, el alimento de la invención presenta una acción de reducción del nivel sérico de colesterol en el ser humano.

Según la invención se utilizan habitualmente partes comestibles, a menos que se indique lo contrario, Por ejemplo, la raíz de las espinacas, que habitualmente no es comestible, no se utiliza en la invención. En el caso de la manzana, se utiliza el fruto de la manzana.

En la presente invención, las verduras o frutas pueden utilizarse en un estado crudo, o en forma térmicamente esterilizada. Alternativamente, las verduras o frutas crudas o térmicamente esterilizadas pueden secarse con aire caliente o liofilizarse, con el fin de preparar una película, placa, bloque o producto sólido similar. Además, son utilizables unos polvos preparados mediante la trituración del producto sólido.

Más alternativamente, las verduras o frutas crudas o térmicamente esterilizadas pueden prensarse o exprimirse con el fin de utilizar el producto resultante en su conjunto, o para utilizar únicamente el zumo de verduras o frutas obtenido. También es utilizable un concentrado del zumo de verduras o frutas, o un producto en polvo, gránulos, comprimidos o similar preparado mediante el secado y procesamiento del concentrado. Resulta adicionalmente utilizable un zumo obtenido a partir de verduras o frutas crudas o térmicamente esterilizadas utilizando una tela filtrante adecuada o similar y un líquido sobrenadante obtenido mediante centrifugación del filtrado. El líquido sobrenadante puede secarse con aire caliente o liofilizarse para obtener una película, placa, bloque o producto sólido similar. El producto sólido puede ser molido para obtener unos polvos.

De esta manera, para la utilización en la invención, las verduras o frutas anteriormente indicadas pueden procesarse mediante un procedimiento convencional que comprende cualquier combinación de operaciones, tales como el lavado, clasificación, pelado, deshuesado, prensado, exprimido, filtración, separación, concentración, calentamiento, enfriamiento, homogeneización y secado.

El alimento [1-A] puede consistir únicamente en brócoli y col o puede contener otros ingredientes utilizados comúnmente para alimentos.

La cantidad de los demás ingredientes que debe añadirse no se encuentra limitada sino que es, por ejemplo, de entre aproximadamente 0,001% y 99,99% en peso respecto a la cantidad total tras la adición de los demás ingredientes.

Entre los ejemplos de otros ingredientes utilizables se incluyen verduras o frutas diferentes de las mencionadas anteriormente, tales como limón, naranja, zanahoria, hojas de rábano japonés, calabaza, pimiento dulce y boniato. Se utilizan en forma de un zumo, un concentrado, gránulo o similares, obtenidos mediante el mismo procedimiento que para las verduras o frutas anteriormente indicadas.

Además, algunos aditivos utilizados comúnmente para la preparación de alimentos o materiales alimenticios pueden utilizarse a modo de otros ingredientes. Entre los ejemplos específicos de aditivos utilizables se incluyen fibra de manzana, fibra de maíz, ácido alginico y fibras similares; lactosa, almidón y excipientes similares; sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, oligosacáridos y edulcorantes similares; vitaminas, calcio y complementos nutricionales similares; espesantes, condimentos, colorantes, etc.

Las otras verduras o frutas y aditivos pueden seleccionarse según la utilización pretendida y la forma del alimento, la preferencia del usuario y otros factores, y utilizarse en una combinación adecuada.

En caso necesario, el alimento puede conformarse o mezclarse en un producto alimenticio deseado, tal como: unos polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, dulces, goma de mascar, turrón, chocolate, gelatina, galletas, pastel, pan, fideos, una bebida, zumo de verdura, margarina, bebida fermentada láctica, miso (pasta de soja), yogur o alimento fermentado similar, pastel de pescado, pasta de pescado hervido o pasta de alimento marino similar, jamón, embutido, leche procesada, queso o producto alimenticio de animal doméstico similar, o salsa de carne, aderezo, salsa, salsa de soja o condimento similar. De entre dichos productos alimenticios resulta preferida una bebida, en particular zumo de verdura, como la forma de alimento de la invención.

El alimento puede utilizarse como material alimenticio para preparar un producto alimenticio deseado, tal como los alimentos indicados anteriormente. El material alimenticio puede utilizarse individualmente para preparar un producto alimenticio o puede combinarse con otros materiales alimenticios para preparar un producto alimenticio.

El alimento puede ingerirse en forma de una mezcla con un alimento preparado, tal como una sopa deshidratada o zumo en polvo, o como solución o dispersión en zumos envasados o similares.

Por lo tanto, el alimento de la invención puede utilizarse como alimento saludable, alimento funcional, alimento para un uso saludable, un alimento para personas enfermas, etc.

[1-B]

En el caso de que el alimento de la presente invención se utilice como alimento con una acción reductora del nivel sérico de colesterol en el ser humano, el alimento contiene brócoli y col y opcionalmente contiene además elementos seleccionados de entre bolsa de pastor, *suzushiro*, *hatazao*, *tagarashi*, hierba pastel, *oobatanetsukebana*, *yamagarashi*, berro, *takana*, *karashina*, rábano picante japonés, *yurivasabi*, col china, *hinona*, *sugukina*, nabo, colza, coles de Bruselas, rábano japonés y hojas de rábano japonés según las reivindicaciones 1 a 9. Dichas plantas comestibles presentan una actividad inhibidora de la síntesis del colesterol en los hepatocitos, que es el mecanismo de acción para reducir el nivel sérico de colesterol en el ser humano más eficaz, y para reducir el nivel de lipoproteína de baja densidad-colesterol (LDL-Col), un colesterol dañino. El alimento de la invención, que contiene dichas plantas, presenta una elevada acción reductora del nivel sérico de colesterol en el ser humano y una elevada acción reductora del nivel de LDL-Col en el ser humano. Es decir, el alimento de la invención resulta eficaz para mejorar el metabolismo de los lípidos. El alimento [1-B] puede ingerirse en forma de un alimento saludable, un alimento funcional, un alimento para un uso saludable específico, un alimento para personas enfermas, etc.

El alimento se encuentra limitado al uso en el ser humano y no está destinado a la utilización como alimento o pienso para animales no humanos (perros, gatos, conejos, ratones, ratas, etc.).

Resulta particularmente preferido que el alimento contenga brócoli y col y adicionalmente por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en bolsa de pastor, *suzushiro*, *hatazao*, *tagarashi*, hierba

pastel, *oobatanetsukebana*, *yamagarashi*, berro, *takana*, *karashina*, rábano picante japonés, *yuriwasabi*, col china, *hinona*, *sugukina*, nabo y colza, según las reivindicaciones 1 a 9.

5 El contenido total de dichas plantas (verduras) en el alimento varía según el tipo de alimento que debe prepararse y las diferencias entre usuarios (diferencias individuales, diferencias raciales, etc.) y no se encuentra limitado con la condición de que el efecto reductor del nivel sérico de colesterol en el ser humano pueda alcanzarse. Resulta adecuado que el contenido total sea de entre aproximadamente 0,01% y 100% en peso, preferentemente de entre aproximadamente 1,0% y 99,9% en peso.

10 Un contenido total inferior a 0,01% en peso puede resultar en un efecto de mejora del metabolismo de los lípidos insuficiente, por lo tanto no deseable.

15 El alimento puede contener otros ingredientes además de las plantas anteriormente indicadas, con la condición de que no resulte perjudicado el efecto de reducción del nivel sérico de colesterol en el ser humano.

Entre los demás ingredientes utilizables se incluyen col rizada, habas de soja, avena, cebada y plantas similares que es conocido que presentan una acción reductora del nivel de colesterol. Además, pueden añadirse otras plantas utilizadas comúnmente en alimentos, tales como apio, lechuga, espinacas, *komatsuna* (*Brassica rapa* L.), perejil, manzana y limón, que han sido procesados anteriormente de la manera anteriormente indicada.

20 En particular, el alimento preferentemente contiene por lo menos un elemento seleccionado de entre apio, lechuga, espinacas, *komatsuna*, perejil, manzana y limón, además de la combinación de brócoli y col.

25 El alimento puede contener, a modo de ingredientes adicionales, aditivos utilizados comúnmente en la industria alimentaria, tales como almidones, lactosa, celulosa, dextrina, alcoholes de azúcar, mucopolisacáridos y excipientes similares, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, oligosacáridos y edulcorantes similares, y vitaminas, calcio y complementos nutricionales similares.

30 El alimento puede prepararse mediante la adición a los materiales de partida para la preparación de un alimento de las plantas procesadas de la manera anteriormente indicada, o las plantas procesadas diluidas con un excipiente o parte de los materiales de partida, o una solución o dispersión de las plantas procesadas en etanol, agua o similar, en una etapa apropiada de la producción. A continuación, la mezcla resultante se mezcla de una manera convencional, seguido de un procedimiento ordinario para la preparación del alimento. La etapa de mezcla puede llevarse a cabo bajo calentamiento.

35 Alternativamente, el alimento puede prepararse mediante la adición de las plantas procesadas de la manera anteriormente indicada o una mezcla o solución de las plantas procesadas, a un producto alimenticio preparado, seguido de la mezcla de una manera convencional.

40 El alimento se encuentra limitado a la utilización en el ser humano y no está destinado a la utilización como alimento o pienso para animales no humanos (perros, gatos, conejos, ratas, ratones, etc.).

45 El alimento no se encuentra limitado en la forma y puede conformarse en cualquiera de las formas indicadas. Alternativamente, el alimento puede ingerirse en forma de una mezcla con un producto alimenticio preparado, tal como sopa deshidratada o zumo en polvo, o en forma de una solución o dispersión en zumo envasado.

50 La ingesta del alimento puede determinarse según la forma del alimento, la edad, el peso, el sexo y las condiciones de salud del usuario, y el propósito de la ingesta, sin limitación. Habitualmente resulta preferido que la ingesta diaria en el adulto del alimento sea de entre aproximadamente 5 y 1.000 ml en el caso de que el alimento se encuentre en una forma líquida, o de entre aproximadamente 0,1 y 100 g en el caso de que el alimento se encuentre en una forma sólida. La ingesta diaria preferentemente se divide en varias raciones.

55 El alimento puede ingerirse en cualquier momento del día, es decir, antes, después o entre comidas. La ingesta antes del desayuno, comida del mediodía o cena o la ingesta en un estómago vacío, resultan particularmente eficaces.

La ingestión del alimento reduce el nivel sérico de colesterol en el ser humano sin restricciones en la dieta o ejercicios programados.

60 El alimento puede utilizarse en combinación con un agente preventivo o terapéutico convencional para la hipercolesterolemia, tal como Mevalotin. En la utilización combinada, puede reducirse la cantidad del agente convencional, ya que la acción reductora del nivel de colesterol del alimento de la invención compensará la reducción. De esta manera, la utilización combinada con el alimento de la invención resulta ventajosa en una prevención o tratamiento a largo plazo, desde el punto de vista de los efectos secundarios.

65 Las verduras o frutas que deben utilizarse como ingredientes activos del alimento de la presente invención han

sido utilizados como alimento desde hace mucho tiempo y por lo tanto pueden ingerirse o administrarse con seguridad durante un periodo prolongado, con fines profilácticos o terapéuticos.

### Mejor modo de poner en práctica la invención

5 Los Ejemplos de ensayo y Ejemplos de ensayo comparativos a continuación se proporcionan con el fin de ilustrar la presente invención en detalle adicional. En estos ejemplos los porcentajes son todos en peso (% p/p), a menos que se indique lo contrario.

### 10 Ejemplo de ensayo 1: ensayo de la actividad inhibidora de la síntesis del colesterol en los hepatocitos

#### (i) Composición y método de preparación de la muestra de ensayo

15 Se filtraron a través de un filtro de gasa zumos obtenidos a partir de las muestras vegetales (1.000 g cada una) mostradas en la Tabla 1, y los filtrados resultantes se filtraron mediante centrifugación a 10.000 g. Los sobrenadantes obtenidos mediante la filtración centrífuga se liofilizaron con el fin de obtener las muestras de ensayo mostradas en la Tabla 2.

20 Tabla 1

Composición de muestra vegetal (%)								
Muestra vegetal	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8
Brócoli	100	-	-	-	-	-	75	75
Bolsa de pastor	-	100	-	-	-	-	-	-
Hierba pastel	-	-	100	-	-	-	-	-
Col china	-	-	-	100	-	-	-	-
Col	-	-	-	-	100	-	25	-
Hojas de rábano japonés	-	-	-	-	-	100	-	25
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabla 2 muestra de ensayo

Muestra vegetal	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8
Muestra de ensayo	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8
Peso de muestra de ensayo tras la liofilización (g)	65	42	54	41	54	36	62	58

#### 25 (2) Método de ensayo

Se utilizaron las muestras de ensayo S-1 a S-8 mostradas en la Tabla 2 a modo de materiales de ensayo y se utilizaron comprimidos que contenían 5,6% de pravastatina sodio (nombre comercial: Mevalotin) como material de control positivo. Estos materiales se molieron en un mortero y se utilizaron.

30 Se inocularon en placas de 6 pocillos células HepG2 ( $2 \times 10^5$  células) cultivadas en DMEM que contenía FCS al 10% y se incubaron durante 3 días (sustancialmente confluyentes). Tras eliminar el medio de cultivo, los materiales de ensayo S-1 a S-8 y el material de control positivo se diluyeron todos con DMEM y se mezclaron con  $^{14}\text{C}$ -ácido acético, se introdujeron individualmente en las placas de 6 pocillos, seguido de una incubación de 35 2 horas. A continuación, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS, se disolvieron en KOH y se saponificaron. Los productos saponificados se sometieron a extracción en éter y se desecaron.

40 Los extractos secos se disolvieron en acetona-etanol y se añadió digitonina al 0,5% a cada una de las soluciones. A continuación, se midió el nivel de radioactividad de los precipitados resultantes utilizando un contador de centelleo.

#### (3) Resultado del ensayo

45 La Tabla 3 representa los resultados de ensayo, es decir, las concentraciones de los materiales de ensayo y el material de control positivo que provocan una inhibición del 50% de la síntesis de colesterol en las células HepG2.

Tabla 3

Concentración para el 50% de inhibición de la síntesis de colesterol			
Muestra de ensayo	Concentración (%)	Proporción de titulación respecto al material de control positivo	Título corregido basándose en el rendimiento (referencia: S-7)
S-1	0,49	1/245	1/234
S-2	0,37	1/185	1/273
S-3	0,46	1/230	1/264
S-4	0,40	1/200	1/302
S-5	1,09	1/545	1/626
S-6	0,78	1/390	1/672
S-7	0,42	1/210	1/210
S-8	0,40	1/200	1/213
Material de control positivo (Mevalotin)	0,002	1/1	1/1

5 En la Tabla 3, "proporción de titulación respecto al control positivo" indica un valor obtenido mediante la división de 0,002% (la concentración del control positivo (Mevalotin) para la inhibición al 50% de la síntesis del colesterol) por la concentración de cada material de ensayo para la inhibición al 50% de la síntesis del colesterol. De esta manera, el valor indica la proporción de titulación de cada material de ensayo respecto a un peso igual del material de control positivo.

10 La expresión "título corregido basándose en el rendimiento (referencia: S-7)" en la Tabla 3 se refiere a un valor obtenido mediante la corrección de la proporción de titulación respecto al control positivo basándose en el rendimiento de cada material de ensayo en la Tabla 2, utilizando la muestra de ensayo S-7 como referencia. Este valor se presenta de manera que las actividades de inhibición de la síntesis de colesterol de las muestras vegetales originales para la preparación de los materiales de ensayo puedan compararse entre sí.

15 Por lo tanto, en teoría, al encontrar las dosis de muestra de ensayo S-7 y del material de control positivo (Mevalotin) que muestran una acción reductora del nivel sérico de colesterol equivalente a partir de los resultados de un ensayo clínico de administración de la muestra de ensayo S-7 y el material de control positivo a un grupo de hipercolesterolemia, puede estimarse una dosis adecuada de cada muestra vegetal basándose en el título corregido.

20 En el Ejemplo de ensayo 1, se descubrió una actividad inhibidora de la síntesis de colesterol únicamente en la fracción soluble en agua de cada muestra de ensayo. La fracción de etanol, la fracción de acetona y la fracción de acetato de etilo de cada muestra de ensayo también se sometieron a ensayo para la actividad inhibidora de la síntesis de colesterol pero se encontró que no presentaban dicha actividad.

### 35 **Ejemplo de ensayo 2: ensayo clínico humano**

30 De entre las muestras de ensayo en las que se encontró actividad inhibidora de la síntesis de colesterol en hepatocitos en el Ejemplo de ensayo 1, las muestras vegetales T-1, T-5 y T-7 y la muestra de ensayo S-7 fueron utilizados en un ensayo clínico humano en grupos de sujetos de hipercolesterolemia con el fin de determinar la presencia o ausencia de un efecto clínico y la correlación entre el efecto clínico y la actividad inhibidora de la síntesis de colesterol.

#### 35 (1) Contenido del ensayo clínico

(1-1) Se dividieron ochenta sujetos de hipercolesterolemia en 4 grupos. Cada sujeto recibió dos latas al día de las muestras de ensayo (bebidas envasadas) mostradas en la Tabla 4, durante 4 semanas, con el fin de evaluar el efecto de mejora de los índices sanguíneos, tales como el nivel sérico de colesterol.

40 (1-2) Se ingirió sangre antes y después del periodo de ensayo de 4 semanas (semana 0 y semana 4).

(1-3) Durante el periodo de ensayo, se permitió a los sujetos que continuaran con su dieta y actividad habitual, sin restricciones de la dieta o ejercicios programados.

#### 45 (2) Sujetos de ensayo clínico

El ensayo clínico se llevó a cabo en pacientes de hipercolesterolemia que cumplieran los criterios siguientes.

#### 50 (2-1) Criterios de selección

- i) Pacientes con un nivel de colesterol total sérico de 240 (mg/dl) o superior
- ii) Pacientes que entendían el propósito y el contenido del ensayo y que consintieron ser sujetos de ensayo

(2-2) Criterios de exclusión

- i) Pacientes con una complicación de una enfermedad hepática, diabetes o enfermedad similar.
- ii) Pacientes administrados con un agente terapéutico bajo tratamiento de hipercolesterolemia.
- iii) Pacientes considerados inadecuados por el médico por cualesquiera otros motivos.

(3) Muestra de ensayo

Los zumos vegetales exprimidos a partir de las muestras vegetales T-1, T-5 y T-7 se filtraron y los filtrados se envasaron en latas (160 g en cada lata), obteniendo las muestras de ensayo. Además, se preparó otra muestra de ensayo mediante el envasado, en cada lata, de 160 g de una solución de 9,92 g de muestra de ensayo S-7 (correspondiente a 160 g de muestra vegetal T-7) en agua purificada.

Tabla 4

Muestra de ensayo para el Ejemplo de ensayo 2				
Muestra de ensayo	Contenido y peso del mismo (g)		Peso del producto final (g)	Dosis diaria
O-1	T-1	60	160	2 latas (320 g)
O-2	T-2	60	160	2 latas (320 g)
O-3	T-7	60	160	2 latas (320 g)
O-4	S-7	0,92	160	2 latas (320 g)

(4) Resultado del ensayo

La Tabla 5 muestra el cambio y tasa de reducción antes y después del ensayo clínico del nivel de colesterol total en los cuatro grupos de ensayo. La Tabla 6 muestra el cambio y la tasa de reducción del nivel de LDL-colesterol.

Tabla 5

Grupo de sujetos	Cambio del nivel de colesterol total		
	Semana 0 (mg/dl)	Semana 4 (mg/dl)	Tasa de cambio (%) {Nivel de cambio (mg/dl)}
Grupo O-1	253,4±26,9	226,5±23,3**	▲ 10,6 (26,9)
Grupo O-2	252,6±23,1	243,8±21,5*	▲ 3,5 (8,8)
Grupo O-3	252,4±27,9	223,3±24,6**	▲ 11,5 (29,1)
Grupo O-4	253,7±26,3	223,5±22,3**	▲ 11,9 (30,2)

En la tabla, \* indica P<0,05 y \*\* indica P<0,01.

Tabla 6

Grupo de sujetos	Cambio del nivel de colesterol total		
	Semana 0 (mg/dl)	Semana 4 (mg/dl)	Tasa de cambio (%) {Nivel de cambio (mg/dl)}
Grupo O-1	171,4±23,0	147,5±21,5**	▲ 13,9 (23,9)
Grupo O-2	168,2±26,5	160,5±23,3	▲ 4,6 (7,7)
Grupo O-3	170,7±23,3	144,6±21,7**	▲ 15,3 (26,1)
Grupo O-4	171,0±24,8	143,3±21,1**	▲ 16,2 (27,7)

En la tabla, \*\* indica P<0,01.

La Tabla 5 revela que la ingesta del alimento de la presente invención redujo el nivel de colesterol total en todos los grupos, Grupo O-1 a O-4.

En particular, el nivel de colesterol total en el Grupo O-4 se redujo de media en 11,9% mediante la ingesta durante 4 semanas. En comparación con la tasa de reducción alcanzada con diferentes dosis de Mevalotin (el material de control positivo utilizado en el Ejemplo de ensayo 1), la tasa de reducción en el Grupo O-4 fue sustancialmente equivalente a la tasa de reducción alcanzada mediante la administración durante 4 semanas de Mevalotin a una dosis diaria de 5 mg (11,1%). La dosis diaria prescrita de Mevalotin era de 10 mg, que puede reducir el nivel de colesterol total en 18% a 20%.

La magnitud del cambio en el nivel de colesterol representada en las Tablas 5 y 6 revela que el factor principal de

la reducción del nivel de colesterol total es la reducción de LDL-colesterol.

Al comparar los títulos corregidos mostrados en la Tabla 3 y los resultados mostrados en la Tabla 5, la tasa de reducción en el Grupo O-3 (T-7) fue de ▲ 11,5%, que es prácticamente igual a la tasa de reducción en el Grupo O-4 (S-7), de ▲ 11,9%. Esto concuerda sustancialmente con el hecho de que, en el caso de la muestra de ensayo S-7, la proporción de título corregido a título original era de 1:1.

La tasa de reducción en el Grupo O-1 (T-1) fue de ▲ 10,6%, mientras que la tasa de reducción en el Grupo O-4 (S-7) fue de ▲ 11,9%. La proporción de los dos valores (▲ 10,6 % : ▲ 11,9%) era de 0,89:1, que es prácticamente igual a la proporción de títulos corregida de la muestra de ensayo S-1 a la muestra de ensayo S-7 (0,90:1). Además, la proporción de tasa de reducción en el Grupo O-5 (T-5) (▲ 3,5%) a tasa de reducción en el Grupo O-4 (S-7) (▲ 11,9%) era de 0,29:1, que es prácticamente igual a la proporción de títulos corregida de muestra de ensayo T-5 a muestra de ensayo S-7 (0,34:1).

Respecto a los índices de seguridad, no se observaron cambios en los índices relacionados con el hígado, tales como GOT, GPT, ALP, γ-GTP y LDH-5, o en índices relacionados con el músculo cardíaco o el músculo esquelético, tales como CPK, LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4, creatina y creatinina, o en índices relacionados con el hígado, tales como BUN, creatinina y ácido úrico.

Respecto a los índices de suficiencia nutritiva, no se observaron cambios en las proteínas totales, albúmina, inmunoglobulina, colina esterasa, amilasa sérica o índices similares en el suero, o en el recuento eritrocitario, nivel de hemoglobina, recuento plaquetario, hematocrito, recuento leucocitario, fracciones de leucocitos (tales como leucocitos basófilos, leucocitos acidófilos, linfocitos y monocitos) o índices similares.

Tal como resulta evidente a partir de lo expuesto anteriormente, la acción reductora del colesterol sérico en el ser humano del alimento de la presente invención se manifiesta principalmente en el mecanismo de actividad inhibidora de la síntesis de colesterol en los hepatocitos. Es decir, el alimento de la invención reduce selectivamente la lipoproteína de baja densidad-colesterol (LDL-Col), reduciendo de esta manera el colesterol total en suero, y por lo tanto resulta eficaz para mejorar el metabolismo de los lípidos.

La acción reductora del nivel sérico de colesterol del alimento de la invención era baja en comparación con el de Mevalotin, una medicina, pero el alimento de la invención se encontraba completamente libre de efectos secundarios sobre el hígado o el músculo cardíaco.

Por lo tanto, el alimento de la invención es suficientemente significativo para los fines de mantener la buena salud de las personas que presentan un nivel sérico de colesterol ligeramente superior al nivel normal, ya que según la invención puede reducirse el colesterol sérico en el ser humano mediante la ingesta de una mezcla de verduras ingeridos comúnmente que se encuentran libres del riesgo de efectos secundarios desconocidos habitualmente presentes en las nuevas medicinas.

**Ejemplo comparativo 1**

A continuación se proporcionan los resultados de un ensayo en el que se administró en ratas un zumo de verduras mixto que contenía cantidades adecuadas de brócoli, col, hojas de rábano japonés, apio, lechuga, espinacas, *komatsuna*, perejil y manzana.

Se dividieron diez ratas SD-SPF (macho, de 4 semanas de edad) en 2 grupos. El grupo A (grupo de control) se alimentó con sólo una dieta estándar *ad libitum* mientras que el grupo B (grupo de ensayo) fue alimentado con una dieta estándar y el zumo de verduras mixto *ad libitum*.

En general, las dietas excesivamente ricas en grasas, tales como las dietas cargadas de grasa, no fueron utilizadas durante el tratamiento profiláctico o terapéutico para reducir el nivel de colesterol, aunque el tratamiento no implicase restricciones en la dieta. Por lo tanto, en los ejemplos de ensayo de la presente invención, las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar, no una dieta cargada de grasas, con el fin de evaluar la acción reductora del colesterol sérico del zumo de verduras mixto.

La Tabla 7 representa el nivel de colesterol total en cada grupo antes y 4 semanas después del inicio del ensayo.

Tabla 7

Grupo de sujetos	Cambio del nivel de colesterol total		
	Semana 0 (mg/dl)	Semana 4 (mg/dl)	Tasa de cambio (%) [Magnitud del cambio (mg/dl)]
Grupo A	111,8	74,2	▲ 33,6 (37,6)
Grupo B	114,6	92,2	▲ 19,5 (22,4)

5 El nivel de colesterol total se redujo no sólo en el Grupo B en el que se había administrado zumo de verduras mixto además de la dieta estándar, sino también en el Grupo A que sólo había recibido la dieta estándar. Por el contrario, la cantidad y tasa de cambio en el Grupo A, que había sido alimentado con solo dieta estándar, fueron superiores a los del Grupo B.

Los resultados anteriormente indicados demuestran que el zumo de verduras mixto que contenía brócoli, col, hojas de rábano japonés y otras verduras no presenta una acción de reducción del colesterol total en ratas.

10 A continuación se proporcionan ejemplos de formulación de alimentos y medicinas según la presente invención.

**Ejemplo de formulación 1: comprimidos**

Lactosa	80,0%
Gelatina	10,0%
Brócoli liofilizado	1,0%
Col liofilizada	1,0%
Saborizante de frutas	0,5%
Agua	7,5%

15 **Ejemplo de formulación 2: bebida**

Zumo de manzana	20,0 %
Puré de brócoli	20,0 %
Zumo de col	10,0 %
Zumo de limón concentrado	0,5 %
Pigmento	0,05%
Saborizante	0,5 %
Agua	48,95%

## REIVINDICACIONES

1. Producto alimenticio que comprende brócoli y col para la utilización en la reducción del colesterol sérico humano superior al normal.
- 5 2. Producto alimenticio para la utilización según la reivindicación 1, en el que el alimento contiene además hojas de rábano japonés o col china.
- 10 3. Producto alimenticio para la utilización según la reivindicación 1, en el que el alimento contiene además por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en coliflor, col rizada, bolsa de pastor, *suzushiro* (*Arabis flagellosa* Miq.), *hatazao* (*Arabis glabra*), *tagarashi* (*Cardamine flexuosa*), hierba pastel, *oobatanetsukebana* (*Cardamine scutata*), *yamagarashi* (*Barbarea vulgaris* R. Br. var. *stricta* Regel), berro, *takana* (*Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *integrifolia* Sinsk.), *karashina* (*Brassica juncea* Czern. et Coss.), rábano picante japonés, *yuriwasabi* (*Wasabia tenuis*), *hinona* (*Brassica campestris* var. *akana*), *sugukina* (*Brassica campestris* var. *neosuguki*), nabo, colza, espinaca, *komatsuna* (*Brassica rapa* L.), apio, perejil, lechuga, manzana, col china, coles de Bruselas, rábano japonés y hojas de rábano japonés.
- 15 4. Producto alimenticio para la utilización según la reivindicación 1, en el que el alimento contiene además por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en coliflor, col rizada, bolsa de pastor, *suzushiro* (*Arabis flagellosa* Miq.), *hatazao* (*Arabis glabra*), *tagarashi* (*Cardamine flexuosa*), hierba pastel, *oobatanetsukebana* (*Cardamine scutata*), *yamagarashi* (*Barbarea vulgaris* R. Br. var. *stricta* Regel), berro, *takana* (*Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *integrifolia* Sinsk.), *karashina* (*Brassica juncea* Czern. et Coss.), rábano picante japonés, *yuriwasabi* (*Wasabia tenuis*), *hinona* (*Brassica campestris* var. *akana*), *sugukina* (*Brassica campestris* var. *neosuguki*), nabo, colza, espinaca, *komatsuna* (*Brassica rapa* L.), apio, perejil, lechuga y manzana.
- 20 5. Producto alimenticio para la utilización según la reivindicación 1, en el que el alimento contiene además por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en bolsa de pastor, *suzushiro* (*Arabis flagellosa* Miq.), *hatazao* (*Arabis glabra*), *tagarashi* (*Cardamine flexuosa*), hierba pastel, *oobatanetsukebana* (*Cardamine scutata*), *yamagarashi* (*Barbarea vulgaris* R. Br. var. *stricta* Regel), berro, *takana* (*Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *integrifolia* Sinsk.), *karashina* (*Brassica juncea* Czern. et Coss.), rábano picante japonés, *yuriwasabi* (*Wasabia tenuis*), col china, *hinona* (*Brassica campestris* var. *akana*), *sugukina* (*Brassica campestris* var. *neosuguki*), nabo, colza, coles de Bruselas, rábano japonés y hojas de rábano japonés.
- 30 6. Producto alimenticio para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el alimento contiene además por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en coles de Bruselas, rábano japonés y hojas de rábano japonés y por lo menos uno de entre bolsa de pastor, *suzushiro*, *hatazao*, *tagarashi*, hierba pastel, *oobatanetsukebana*, *yamagarashi*, berro, *takana*, *karashina*, rábano picante japonés, *yuriwasabi*, col china, *hinona*, *sugukina*, nabo y colza.
- 35 7. Producto alimenticio para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que por lo menos un elemento es un fruto o una verdura y en un estado crudo o es esterilizado térmicamente.
- 40 8. Producto alimenticio para la utilización según la reivindicación 7, en el que el alimento es un polvo.
- 45 9. Producto alimenticio para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 7 a 8, en el que el alimento es un zumo de verduras o de frutas, o un concentrado de un zumo de verduras o de frutas.