

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 894**

51 Int. Cl.:

| | | |
|-------------------|------------------------------|-----------|
| A61K 36/21 | (2006.01) A23L 33/105 | (2006.01) |
| A61P 3/00 | (2006.01) A23L 33/18 | (2006.01) |
| A61P 3/04 | (2006.01) | |
| A61P 3/06 | (2006.01) | |
| A61P 35/00 | (2006.01) | |
| A61K 35/74 | (2015.01) | |
| A61K 38/10 | (2006.01) | |
| A61K 38/16 | (2006.01) | |
| A61K 35/12 | (2015.01) | |
| A61K 36/00 | (2006.01) | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2006 PCT/SE2006/000676**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2017 WO06132586**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2006 E 06747869 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 1893224**

54 Título: **Uso de una membrana de célula vegetal para el tratamiento de la obesidad**

30 Prioridad:

10.06.2005 SE 0501336

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

17.09.2018

73 Titular/es:

**THYLABISCO AB (100.0%)
Uardavägen 8F
224 71 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**PER-ÅKE ALBERTSSON y
CHARLOTTE ERLANSSON-ALBERTSSON**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 681 894 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

Uso de una membrana de célula vegetal para el tratamiento de la obesidad

5 **Campo de invención**

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende al menos una membrana celular o partes de la misma, para la reducción de la actividad lipolítica y/o para retrasar la digestión de grasas, para suprimir el apetito, para disminuir el peso corporal y/o para reducir los lípidos sanguíneos. La invención también se refiere al uso de dicho péptido hidrófobo en un producto farmacéutico así como a una composición alimenticia y a métodos de tratamiento de un mamífero con dicha composición.

Antecedentes de invención

15 El sobrepeso y la obesidad se han convertido en un problema mundial creciente. La obesidad conduce a un aumento concomitante en varias enfermedades tales como diabetes, arteriosclerosis, hipertensión así como determinadas formas de cáncer. Una dieta rica en grasas, o bien solas o bien con sacarosa añadida, es uno de los factores más importantes que provocan obesidad, puesto que estas dietas promueven fácilmente que se coma en exceso. Por tanto, es de gran importancia optimizar el control del apetito por grasa de la dieta para reducir la obesidad. La saciedad de grasa se dirige principalmente desde el intestino, tal como se demuestra a través de la infusión de grasa en el intestino, que reduce la ingesta de alimento (Greenberg D. y Smith, G.P., *Psychosomatic medicine* 58: 559-569, 1996). El motivo de la supresión de la ingesta de alimento en estas condiciones es la liberación de diversos péptidos de saciedad en el intestino por el contacto de la grasa con la mucosa intestinal. Puesto que los ácidos grasos, los productos de la grasa de la dieta, se absorben inmediatamente después de su producción, una tasa reducida de digestión de grasas optimizaría teóricamente la saciedad de grasa.

La enzima clave durante la digestión intestinal de grasas es la lipasa pancreática. El uso de un inhibidor de lipasa (Xenical) como fármaco contra la obesidad está bien establecido (Sjöstrom L. *et al*, *Lancet* 352: 167-172, 1998). El inhibidor de lipasa no sólo reduce el peso corporal sino que también mejora la resistencia a la insulina. Tales hallazgos proporcionan por tanto fuertes evidencias de un papel de la digestión intestinal de las grasas en la saciedad de grasa y la sensibilidad a la insulina. La desventaja de este inhibidor de lipasa es que inhibe todos los tipos de lipasas y produce esteatorrea debido a una digestión de grasas fuertemente alterada. Por tanto, es de importancia primordial desarrollar un compuesto natural que retrase la digestión de grasas de un modo más suave sin provocar esteatorrea como efecto secundario.

En el documento WO 2004/016092, se dan a conocer polvo o extractos de hojas de plantas con efectos contra la obesidad y alimentos contra la obesidad que los comprenden, y más particularmente, composiciones de alimentos contra la obesidad que comprenden polvo o extractos de uno o más seleccionados del grupo que consiste en hojas de caqui, hojas de trigo sarraceno, hojas de cauquí, hojas de endivia y un ginseng.

Se ha encontrado un compuesto natural de alto valor nutritivo que retrasa la digestión de grasas, suprime el apetito aumentando las hormonas de saciedad y disminuye los niveles de triglicéridos séricos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición para la reducción de la actividad lipolítica y/o para retrasar la digestión de grasas, para suprimir el apetito, para disminuir el peso corporal y/o para reducir los lípidos sanguíneos. Al reducir la actividad lipolítica, la digestión de grasas se retrasará y el apetito se suprimirá y de ese modo una saciedad potenciada para la prevención de por ejemplo la obesidad.

En un primer aspecto la invención se refiere a una composición que comprende una fracción de membrana celular obtenida de una planta o alga, comprendiendo dicha fracción al menos una membrana celular de un cloroplasto o un tilacoide, o partes de los mismos, para su uso en el tratamiento del síndrome metabólico u obesidad.

Según un segundo aspecto la invención se refiere al uso de dicha composición como una composición farmacéutica.

Según un tercer aspecto la invención se refiere al uso de dicha composición como una composición alimenticia.

Según un cuarto aspecto la invención se refiere al uso no terapéutico de una composición que comprende una fracción de membrana celular obtenida de una planta, o alga, comprendiendo dicha fracción al menos una membrana celular de un cloroplasto o un tilacoide, o partes de los mismos, para suprimir el apetito y/o para disminuir el peso corporal.

La composición inventada puede usarse para regular el apetito, tal como para el tratamiento del síndrome metabólico o bien como una enfermedad o bien como un trastorno.

Breve descripción de dibujos

La figura 1 muestra la inhibición de lipasa pancreática mediante membranas biológicas de hojas. Membranas de cloroplastos de espinaca (círculos rellenos); trébol (cuadrados negros); *Arabidopsis thaliana* (triángulos); colza (círculos) y remolacha azucarera (cruces).

La figura 2 muestra la inhibición de lipasa pancreática mediante membranas biológicas: Mitocondrias de tubérculo de patata (cuadrados), mitocondrias de corazón de pollo (círculos rellenos), membrana plasmática de hoja de espinaca (rombos), membranas de *Synechocystis* (cruces) y cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* (triángulos).

La figura 3 muestra la inhibición de lipasa pancreática mediante proteínas de membrana aisladas. Complejo de clorofila a/b de captación de luz, LHC II (triángulos), polipéptido sintético con la misma secuencia de aminoácidos (es decir, VIHCRWAMLGALGCVFPELL) que una de las hélices alfa de LHCII (cruces), transhidrogenasa (rombos) y complejo de citocromo b₆f (cuadrados).

La figura 4 muestra el efecto del tratamiento con membranas de cloroplasto, (tilacoides) durante la dieta rica en grasas durante once días en rata Sprague-Dawley. Ingesta de alimento con membranas de cloroplasto (cuadrados) y sin ellas (triángulos). La ingesta de alimento diaria se facilita como medias \pm E.E.M. de ocho animales en cada grupo (n=8). Los datos sobre el aumento de peso corporal, triglicéridos séricos y colesteroquinina plasmática tras el comienzo del tratamiento con tilacoides se muestran en la tabla 1.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En el contexto de la presente solicitud e invención, se aplican las siguientes definiciones:

El término “membrana celular” pretende significar una membrana celular biológica natural o producida de manera sintética modificada o no modificada, de origen animal, vegetal o microbiano, en la que la membrana celular comprende membranas celulares intactas o fracciones de las mismas así como partes de las mismas o mezclas de partes y membranas celulares intactas, tales como los péptidos hidrófobos o proteínas hidrófobas de dicha membrana celular. Parte de la membrana celular puede tener entre 0,1 y 0,5 μ m y puede comprender únicamente uno o más péptidos transmembrana.

El término “péptido hidrófobo” pretende significar un péptido que tiene al menos el 85% de residuos de aminoácido hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, cisteína junto con unos cuantos aminoácidos con residuos cargados tales como arginina y ácido glutámico.

El término “actividad lipolítica” pretende significar la tasa de hidrólisis de lípidos por lipasas.

El término “péptido transmembrana” pretende significar al menos los residuos de aminoácido que forman la parte transmembrana de la proteína. El péptido puede ser una o más partes transmembrana de una proteína transmembrana, tal como un tramo que comprende entre 15 y 25 residuos de aminoácido y múltiplos de los mismos.

Composición

La invención se refiere al uso de una composición que comprende al menos una membrana celular o partes de la misma, para la reducción de la actividad lipolítica y/o para retrasar la digestión de grasas, para suprimir el apetito, para disminuir el peso corporal y/o para reducir los lípidos sanguíneos. Al reducir la actividad lipolítica es posible retrasar la digestión de grasas, suprimir el apetito, disminuir el peso corporal y/o reducir los lípidos sanguíneos. De ese modo es posible por primera vez regular eficazmente el apetito de un mamífero, tal como un ser humano u otro animal. Al permitir la posibilidad de regular la actividad lipolítica, una formación lenta de ácidos grasos en el intestino promoverá y prolongará la saciedad.

La composición puede comprender al menos la parte transmembrana de una proteína biológica, en la que dicha parte transmembrana comprende residuos de aminoácido hidrófobos. Por consiguiente la composición comprende una membrana biológica o partes de la misma, en la que dicha membrana biológica comprende al menos dicho péptido hidrófobo. La composición puede comprender al menos un péptido hidrófobo de membrana celular que tiene desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 residuos de aminoácido, tal como 2, 3, 4 ó 5 péptidos hidrófobos que se derivan de la misma proteína o proteínas diferentes y la composición puede comprender

Las membranas celulares biológicas aparecen por ejemplo en todas las células vivas y constituyen una gran parte de la masa celular. Ejemplos de fracciones de membrana celular según la invención son fracciones de membrana celular obtenidas de plantas, algas o fracciones de membrana celular de partes de las mismas, que son sintéticas o una mezcla de las mismas. En procariontes, hay una única membrana plasmática o membranas plasmáticas dobles y

en bacterias fotosintéticas también la membrana fotosintética, los tilacoides. En eucariotas las membranas incluyen la membrana plasmática, el retículo endoplasmático, la membrana de Golgi, la membrana nuclear, la membrana lisosómica, las membranas mitocondriales y para las algas verdes y las plantas también las membranas de cloroplastos que incluyen las dos membranas de la envuelta y la membrana fotosintética, los tilacoides. Las membranas biológicas se componen de proteínas y lípidos. Todas las membranas biológicas contienen proteínas de membrana intrínsecas con una o varias cadenas polipeptídicas transmembrana compuestas por aminoácidos hidrófobos. La mayoría de los lípidos, tales como fosfolípidos y galactolípidos, forman bicapas en las que las proteínas de membrana intrínsecas/transmembrana están incrustadas. Además, se unen proteínas extrínsecas a la superficie de la membrana. Los tilacoides son responsables de la fotosíntesis en plantas, algas verdes y en las bacterias fotosintéticas tales como bacterias púrpuras y verde-azuladas. La membrana del tilacoide consiste en proteínas y lípidos en una razón de aproximadamente el 70/30 por ciento. Hay más de 100 proteínas diferentes en la membrana; en la fracción lipídica predominan los galactolípidos siendo los ácidos grasos principales del tipo de omega-3. Además, la membrana del tilacoide contiene varios pigmentos diferentes, clorofila a, clorofila b, plastoquinonas, los carotenoides β -caroteno, luteína, violaxantina y neoxantina. Esto significa que los tilacoides tienen una composición de alto valor nutritivo y lo mismo se aplica a membranas sintéticas que tienen la misma o sustancialmente la misma composición que los tilacoides, es decir, pueden usarse cloroplastos así como los tilacoides en el aditivo alimentario así como en el producto alimenticio de la invención. Ejemplos de membranas biológicas son los cloroplastos o las membranas de tilacoides y la membranas pueden obtenerse de trébol, colza, remolacha azucarera, diente de león, *Arabidopsis thaliana*, maíz, tabaco, girasol, lechuga, *Chenopodium*, *Atriplex*, espinaca y hierbas o una mezcla de los mismos.

Por consiguiente, si la composición comprende al menos un péptido hidrófobo, dicho péptido puede tener una longitud de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 residuos de aminoácido. Se muestran ejemplos de péptidos en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o mezclas de las mismas así como los péptidos pueden estar operativamente unidos entre sí. Los residuos de aminoácido pueden seleccionarse del grupo que consiste en alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, glicina, cisteína junto con unos cuantos aminoácidos con residuos cargados tales como arginina y ácido glutámico. Los residuos de aminoácido y el péptido pueden producirse de manera sintética o natural y lo mismo se aplica para los residuos de aminoácido, es decir, pueden ser naturales o sintéticos siempre que sean hidrófobos o porten un residuo cargado. La fracción de membrana puede ser una fracción de membrana celular, que se ha tratado con una o más enzimas para proporcionar trozos más pequeños de las membranas celulares.

Dicha membrana biológica o parte de la misma de la invención puede tener una distribución de tamaño de 0,1 μm a aproximadamente 5 μm , tal como 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ó 1,0 μm .

Adicionalmente el péptido hidrófobo puede tener de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 residuos de aminoácido adicionales y puede modificarse también mediante amidación, esterificación, acilación, acetilación, pegilación o alquilación.

Las membranas fotosintéticas son las más abundantes, con respecto a la masa, de todas las membranas biológicas sobre la tierra. Las hojas verdes de plantas constituyen una fuente conveniente y abundante para el aislamiento y la preparación en una gran cantidad de membranas de cloroplasto para el fin de esta invención.

Pueden aislarse membranas biológicas de muchos modos diferentes, tales como los mencionados en los ejemplos. El más común es disgregar en primer lugar las células mecánicamente, lo que produce vesículas de membrana con diferente tamaño y composición. Se retiran residuos celulares grandes mediante centrifugación a baja velocidad y, entonces, las vesículas de membrana del sobrenadante se recogen mediante centrifugación diferencial o centrifugación en gradiente. Alternativamente los residuos celulares grandes se retiran mediante filtración, y las vesículas de membrana se recogen mediante centrifugación.

También es posible diseñar métodos que no implican centrifugación. En este caso los residuos celulares grandes se retiran en primer lugar mediante filtración. Las membranas celulares pueden flocularse entonces, es decir precipitarse mediante diferentes procedimientos tales como:

1. Adición de ácido o una base de manera que se alcanza un pH en el que se logra la precipitación.
2. Adiciones de polímeros con más o menos grupos cargados diferentes, lo que induce la precipitación.
3. Calentamiento de la suspensión de vesículas tal como entre 40-100°C.
4. Recogida de vesículas mediante reparto en un sistema bifásico acuoso mediante lo cual las vesículas se concentran en una fase de volumen pequeño (Albertsson P.Å. Partition of cell Particles and macromolecules. Wiley, Nueva York, 1986).
5. Recogida en una interfase de un sistema bifásico líquido-líquido, tal como el sistema de fases proporcionado en 4) o un sistema de fases de agua-aceite.

6. Recogida en una interfase de un sistema de fases de agua-aceite que conduce a una emulsión.

7. Adsorción sobre material sólido tal como fosfato de calcio, sílice, diversas resinas de intercambio iónico.

8. Congelación y descongelación mediante lo cual los cristales de agua formados concentran las vesículas en agregados, que tras la descongelación floculan.

Los péptidos hidrófobos pueden sintetizarse mediante métodos químicos convencionales, incluyendo síntesis mediante un procedimiento automatizado. En general, se sintetizan análogos de péptidos basándose en la estrategia de protección con Fmoc en fase sólida convencional con HATU (N-ÓXIDO DE HEXAFLUOROFOSFATO DE N-[DIMETILAMINO-1H-1.2.3.-TRIAZOLO[4,5-B]PIRIDIN-1-ILMETILEN]-N-METILMETANAMINIO) como agente de acoplamiento u otros agentes de acoplamiento tales como HOAt-1-HIDROXI-7-AZABENZOTRIAZOL. El péptido se escinde de la resina de fase sólida con ácido trifluoroacético que contiene eliminadores apropiados, lo que también desprotege grupos funcionales de cadenas laterales. El péptido en bruto se purifica adicionalmente usando cromatografía de fase inversa preparativa. Pueden usarse otros métodos de purificación, tales como cromatografía de reparto, filtración en gel, electroforesis en gel o cromatografía de intercambio iónico. Otras técnicas de síntesis, conocidas en la técnica, tales como la estrategia de protección con tBoc, o el uso de diferentes reactivos de acoplamiento o similares pueden emplearse para producir péptidos equivalentes.

Los péptidos pueden sintetizarse alternativamente mediante producción recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.593.866). Una variedad de sistemas huésped son adecuados para la producción de los análogos de péptido, incluyendo bacterias, tales como *E. coli*, levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia*, insectos, tales como Sf9, y células de mamífero, tales como CHO o COS-7. Hay muchos vectores de expresión disponibles para usarse para cada uno de los huéspedes y la invención no se limita a ninguno de ellos siempre que el vector y el huésped puedan producir el péptido antimicrobiano. Pueden encontrarse vectores y procedimientos para la clonación y expresión en *E. coli* en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning.: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1987) y Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Co., 1995).

La composición inventada puede estar en cualquier forma, tal como un extracto natural obtenido mediante un método convencional tal como uno de los mencionados a continuación, así como estar secada, congelada o secada por congelación.

La composición inventada puede usarse como aditivo alimentario y puede mezclarse con otros componentes tales como grasa, mantequilla, margarina, aceites, nata, leche, queso, *brïe*, harina, zumos, refrescos, tés o bien antes de añadirse a un producto alimenticio o bien o durante la adición al producto alimenticio.

Dicho aditivo alimentario o composición alimenticia que comprende dicha composición puede ser sólido, semisólido o estar en una forma líquida. Además puede estar secado por congelación, secado por pulverización o liofilizado. El aditivo alimentario inventado puede usarse en cualquiera clase de producto alimenticio así como usarse solo. Ejemplos de productos alimenticios son grasa, mantequilla, margarina, aceites, nata, leche, queso, *brïe*, harina, zumos, refrescos, tés. Otros ejemplos son yogur, helado, pasteles, pan y aderezos.

La composición inventada también puede usarse como composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende la composición inventada así como un tampón, excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo de una enfermedad que va a tratarse es el síndrome metabólico, o bien como enfermedad o bien como trastorno.

“Farmacéuticamente aceptable” significa un material no tóxico que no disminuye la eficacia de la actividad biológica de los principios activos, es decir, el/los péptido(s) antimicrobiano(s). Tales tampones, portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica (véase Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000).

El término “tampón” pretende significar una disolución acuosa que contiene una mezcla de ácido-base con el fin de estabilizar el pH. Ejemplos de tampones son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazol-láctico, PIPES, SSC, SSPE, POSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

El término “diluyente” pretende significar una disolución acuosa o no acuosa con el fin de diluir el péptido en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

El término “adyuvante” pretende significar cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del péptido. El adyuvante puede ser uno o más de sales de zinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitarse a fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferente composición de acilo.

El excipiente puede ser uno o más de hidratos de carbono, polímeros, lípidos y minerales. Los ejemplos de hidratos de carbono incluyen lactosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados del mismo, poli(ácido acrílico), polisulfonato, copolímeros de polietilenglicol/poli(óxido de etileno), poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno), poli(alcohol vinílico)/poli(acetato de vinilo) de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para conseguir bioadhesión o para proteger el lípido de la degradación química y proteolítica. Ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono, di y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, todos de diferente longitud y saturación de la cadena de acilo, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina de huevo y soja hidrogenada, que se añaden a la composición por motivos similares a los de los polímeros. Ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de zinc y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como reducción de la acumulación de líquido o propiedades de pigmento ventajosas.

Las composiciones de la invención pueden estar también en forma de geles de polímero, en donde se usan polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados del mismo, poli(ácido acrílico), polisulfonato, copolímeros de polietilenglicol/poli(óxido de etileno), poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno), poli(alcohol vinílico)/poli(acetato de vinilo) de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona para espesar la disolución que contiene el péptido.

Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc., por ejemplo, como se dan a conocer en otra parte en el presente documento.

Formas de preparación adecuadas son, por ejemplo gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro) cápsulas, jarabes, emulsiones, microemulsiones, definidas como sistemas termodinámicamente estables ópticamente isotrópicos que consisten en agua, aceite y tensioactivo, fases líquido-cristalinas, definidas como sistemas caracterizados por orden de largo alcance pero desorden de corto alcance (los ejemplos incluyen fases laminar, hexagonal y cubica, continuas o bien de agua o bien de aceite), o sus homólogos dispersados, geles, pomadas, dispersiones, suspensiones, cremas, aerosoles, gotitas o disolución inyectable en forma de ampolla y también preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente excipientes, diluyentes, adyuvantes o portadores tal como se describió anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas se administrarán a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz. Por “dosis farmacéuticamente eficaz” quiere decirse una dosis que es suficiente para producir los efectos deseados en relación con el estado para el que se administra. La dosis exacta depende de la actividad del compuesto, el modo de administración, la naturaleza y la gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del paciente; pueden necesitarse diferentes dosis. La administración de la dosis puede llevarse a cabo tanto mediante administración individual en forma de una unidad de dosis individual o en su lugar varias unidades de dosis más pequeñas como también mediante la administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos.

La presente invención se refiere tanto a seres humanos como a otros mamíferos tales como caballos, perros, gatos, vacas, cerdos, camellos, entre otros. Por tanto los métodos pueden aplicarse a tanto terapia humana como aplicaciones veterinarias. Los objetos adecuados para un tratamiento de este tipo pueden identificarse mediante hitos bien establecidos.

A continuación sigue, como ejemplo de la invención, una descripción del aislamiento de membranas de cloroplasto, los tilacoides, a partir de espinaca y su aplicación en la inhibición de la actividad lipasa pancreática y la reducción de la ingesta de alimento. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención de cualquier manera, conformación o forma, o bien explícita o bien implícitamente.

EJEMPLO 1

Preparación de membranas y proteínas de membrana

Se aislaron tilacoides tal como se describe en Danielsson *et al.* Biochim Biophys Acta 1608, 53-61 (2004) para su uso en el ensayo de lipasa. Para preparar alimentos, se aislaron los tilacoides tal como sigue: se homogeneizaron hojas en una mezcladora y se filtraron a través de cuatro capas de malla de nailon (20 µm). Se centrifugó el filtrado a

5000 g durante 10 min para recoger los tilacoides. Se lavaron estos mediante resuspensión en agua y volvieron a centrifugarse como anteriormente. Extracción de lípidos: Se incubaron 4 ml de suspensión de tilacoides (3,8 mg de clorofila/ml) mezclados con 40 ml de cloroformo/metanol durante 1 h sobre hielo. Tras la centrifugación a 4000 g durante 10 min, se extrajo el sedimento una segunda vez y se centrifugó como anteriormente. Se secó el sedimento al aire y se extrajo con 10 ml de la disolución tampón usada para el aislamiento de tilacoides sobre hielo para retirar proteínas solubles en agua. Se centrifugó la muestra a 4000 g durante 10 min y se recogió el sedimento. Se denominó esto "fracción de proteína de membrana" (figura 1). Se llevó a cabo tratamiento con tripsina incubando los tilacoides con 300 µg de tripsina (Sigma tipo III)/mg de clorofila, en tampón fosfato 20 mM (pH 7,4), durante 45 min a 37°C. Tras añadir fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, para inhibir la tripsina, se recogieron los tilacoides mediante centrifugación durante 10 min a 900 g. Se determinó la clorofila tal como se describió anteriormente (Danielsson *et al.* Biochem Biophys Acta 1608, 53-61 (2004) y la proteína según Bradford (Bradford, M. M. Anal Biochem 72, 248-54 (1976)). Se preparó complejo de captación de luz II (LHCII) tal como se describe en Andersson, B. & Albertsson, P.-Å. J. Chromatogr. 890, 131-141 (1981). Se prepararon mitocondrias a partir de tubérculos de patata según (Petit, P. X., Edman, P., Gardestrom, P. & Ericson, I. Biochim Biophys Acta 890, 377-386 (1987)). Se prepararon membranas plasmáticas a partir de hojas de espinaca según (Kjellbom, P. & Larsson, C. Physiol Plant 62, 501-509 (1984)). Se prepararon membranas a partir de *Synechosystis* según (Norling, B., Zak, E., Andersson, B. & Pakrasi, H. FEBS Lett 436, 189-92 (1998)). Se prepararon cromatóforos a partir de *Rhodospirillum rubrum* según (Wang, H., Franke, C. C., Nordlund, S. & Noren, A. FEMS Microbiol Lett 253: 273-279 (2005)). Antes de su uso, se retiraron proteínas solubles en agua extrínsecas lavando con NaCl 0,5 M, Tris-HCl 25 mM, pH 7,8 seguido por dos lavados con el tampón Tris sólo según (Wang, H., Franke, C. C., Nordlund, S. & Noren, A. FEMS Microbiol Lett 253: 273-279 (2005)). Se preparó transhidrogenasa según (Althage, M. *et al.* Biochim Biophys Acta 1659, 73-82 (2004)) a partir de *E. coli*. Se preparó citocromo b₆f a partir de hojas de espinaca según (Romanowska, E. & Albertsson, P.-Å. Plant Cell Physiol 35, 557-568 (1994)).

25 EJEMPLO 2

Preparación en bruto de membranas celulares (tilacoides)

Se cortaron en trozos hojas de espinaca, o bien frescas o bien congeladas. Se suspendieron estos en agua y se disgregaron mediante una picadora mecánica hasta que la mayoría de las células se rompen. Entonces se filtró la suspensión a través de una red de nailon con un tamaño de poro de 20 µm. Se centrifugó el filtrado a 2000xg durante 5 min. Se resuspendió el sedimento en agua y volvió a centrifugarse a 2000xg durante 5 min. Se almacenó el sedimento congelado o secado. Alternativamente, se añadió un agente de precipitación al filtrado: se acidificó el filtrado mediante la adición de ácido hasta un pH bajo, tal como pH 4-5, de modo que las membranas precipitan. Se lavó el precipitado mediante resuspensión en agua a pH 4-5 y resedimentación del precipitado. Se recogió el precipitado.

EJEMPLO 3

Preparación de fracciones de membrana celular en bruto

Las células, suspendidas en agua, se disgregaron adicionalmente de manera mecánica mediante una picadora de manera que la mayoría de las células se rompen. Se filtró la suspensión para retirar las células que no se rompieron y fragmentos grandes de paredes celulares. Se centrifugó el filtrado a 10000xg durante 10 min. Se resuspendió el sedimento y volvió a centrifugarse a 10000xg durante 10 min. Se recogió el sedimento y se almacenó congelado o secado.

EJEMPLO 4

Preparación de tilacoides a partir de espinaca usando filtración sólo.

Se cortaron en trozos hojas de espinaca, o bien frescas o bien congeladas. Se suspendieron estos en agua y se disgregaron mediante una picadora mecánica hasta que la mayoría de las células se rompen. Entonces se filtró la suspensión a través de una red de nailon con un tamaño de poro de 20 µm. Al filtrado se le añade ácido acético hasta que el pH alcanza 4,7 para inducir la floculación. Cuando el floculado se ha sedimentado en el fondo del recipiente, se retira el sobrenadante por decantación. Entonces se pone el floculado sobre un filtro con un tamaño de poro de 20 µm. Los tilacoides floculados permanecen en el filtro y pueden lavarse con agua a pH 4,7. Se recogen los tilacoides lavados y tras ajustar a un pH deseado se almacenan congelados o secados.

60 EJEMPLO 5

Medición de la actividad lipasa

Se midió la actividad lipasa según lo siguiente (Borgström B. y Erlanson C. European J. of Biochemistry 37: 60-68, 1973): 15 ml de una disolución acuosa que contiene tampón Tris 1 mM pH 7,0, cloruro de calcio 1 mM, cloruro de

sodio 150 mM, taurodesoxicolato de sodio 4 mM, 0,5 µg de lipasa, 1 µg de colipasa.

A esta mezcla se le añaden 0,5 ml de tributirina junto con cantidades crecientes de membranas y los ácidos grasos liberados se miden usando un pH stat.

5 El efecto de las membranas biológicas sobre la actividad lipasa se muestra en la figura 1-2. El efecto de las proteínas de membrana y el polipéptido sintetizado se muestra adicionalmente en la figura 3.

EJEMPLO 6

10 *Producción de un producto alimenticio y el efecto sobre la ingesta de alimento*

Se prepararon pasteles (500 g, el 42% de grasa en energía) del siguiente modo:

| Ingrediente | Cantidad |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Gelatina | 20 g (disuelta en 200 ml de agua y calentada en baño de agua hasta 60-70°C) |
| Caseína | 110 g |
| Almidón | 190 g |
| Aceite de maíz | 15 g |
| Manteca | 90 g |
| Mezcla de vitaminas | 5 g |
| Mezcla de sales | 20 g |
| Colina | 1 g |
| Metionina | 1,5 g |
| Celulosa | 47,5 g |

15 Se suspendieron membranas de cloroplasto (tilacoides, que contenían 1000 mg de clorofila) en 30 g de agua.

Procedimiento:

20 Se mezclaron almidón y aceite en un procesador de alimentos (Bosch Universal). Se añadieron los ingredientes sólidos restantes, seguidos por la disolución de gelatina. Tras mezclar concienzudamente, se añadió finamente agua, con o sin membranas de cloroplasto (tilacoides). Se hornearon los pasteles en un horno a 70°C durante dos días.

25 El experimento mostrado en la figura 4 se realizó del siguiente modo.

Se alojaron ratas Sprague-Dawley hembra (200 g) de B&K, Sollentuna, Suecia en una sala de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) bajo un ciclo de 12 h de luz (6:00 - 18:00)/12 h, se les dio libre acceso al agua y se alimentaron a voluntad con una dieta convencional a menos que se estableciera otra cosa durante los experimentos con dieta rica en grasas. Todos los procedimientos que usaban animales los aprobó el Comité de Ética Animal local de Lund, Lund, Suecia.

Protocolo de alimentación

35 Para la medición del consumo de alimento, se alojaron individualmente las ratas en una jaula y se les dio una dieta rica en grasas durante una semana antes del inicio del estudio. La dieta rica en grasas consistía en una dieta que contenía, en energía, el 42,1% de grasa, el 23,9% de proteína y el 34,0% de hidratos de carbono con una densidad calórica de 4,7 kcal/g tal como se describe (Lindquist *et al.* Regul. Pept. 130: 123-132 (2005)). Se preparó la dieta rica en grasas que contenía tilacoides como para la dieta rica en grasas con la adición de tilacoides purificados a una concentración de 2 mg de clorofila por gramo de alimento. Se midieron diariamente la ingesta de alimento y el peso corporal al inicio y al final del periodo de alimentación. Se monitorizaron cuidadosamente las jaulas para detectar evidencias de derrame de alimento.

45 Tabla 1. Efecto del tratamiento con tilacoides durante la dieta rica en grasas durante once días en rata Sprague-Dawley, véase la figura 4.

| | Control | Tilacoides |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Aumento de peso corporal (g) | 60,5 ± 3,55 | 49,9 ± 8,62* |
| TG séricos (mmol/l) | 1,02 ± 0,13 | 0,62 ± 0,04* |
| CCK plasmática (pmol/l) | 0,68 ± 0,08 | 0,86 ± 0,12* |

Los valores son medias ± E.E. con *nivel de significación de $P < 0,05$ y **nivel de significación de $P < 0,01$ entre dieta de control y tratamiento con tilacoides. TG = triglicéridos, CCK = colecistoquinina

EJEMPLO 7

Emulsión alimenticia

5 Se permitió que los vegetales (300 g) se descongelaran a temperatura ambiente durante 0,5 horas antes de que se procesaran concienzudamente en una mezcladora doméstica. Se obtuvo zumo vegetal alimentando los trozos finamente cortados a una centrifuga de zumo doméstica.

10 Se obtuvo una emulsión de buen sabor suave mediante homogeneización del zumo vegetal (60 g) y aceite de triglicéridos (30 g) con una mezcladora manual equipada con cuchillas de corte de acero inoxidable. Las emulsiones producidas a partir de zumo de brócoli y espinaca se inspeccionaron visualmente para detectar fase de aceite y/o agua libre tras 0,5 horas (almacenamiento a temperatura ambiente) y 10 horas (almacenamiento en nevera).

| Vegetal | Aspecto tras 0,5 horas de almacenamiento. | Aspecto tras 10 horas de almacenamiento. |
|----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Espinaca | Sin fase de aceite libre, sin fase de agua libre | Sin fase de aceite libre, sin fase de agua libre |
| Brócoli | Sin fase de aceite libre, sin fase de agua libre | Sin fase de aceite libre, fase de agua libre |

15 Los resultados de la inspección se resumen en la tabla anterior y muestran que las gotitas de aceite en las emulsiones son muy estables puesto que no pudo observarse coalescencia (sin fase de aceite libre).

20 **Lista de secuencias**

<110> Albertsson, Per-Ake

<120> Uso de una membrana de célula vegetal para el tratamiento de la obesidad

25 <130> W49350016

<140> Documento EP 06747869.3

<141> 09-06-2006

30 <150> SE 0501336-2

<151> 10-06-2005

<160> 3

35 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 20

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Péptido a modo de ejemplo

<400> 1

Val Ile His Cys Arg Trp Ala Met Leu Gly Ala Leu Gly Cys Val Phe
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu
20

50 <210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 681 894 T3

<220>

<223> Péptido a modo de ejemplo

<400> 2

Leu Val His Ala Gln Ser Ile Leu Ala Ile Trp Ala Cys Gln Val Ile
1 5 10 15

5

Leu Met Gly Ala Val
20

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido a modo de ejemplo

15

<400> 3

Leu Ala Met Phe Ser Met Phe Gly Phe Phe Val Gln Ala Ile Val Thr
1 5 10 15

Gly

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una fracción de membrana celular obtenida de una planta o alga, comprendiendo dicha fracción al menos una membrana celular de un cloroplasto o un tilacoide, o partes de los mismos, para su uso en el tratamiento del síndrome metabólico u obesidad.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, para el tratamiento de obesidad.
- 10 3. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha fracción de membrana celular se obtiene de una planta.
- 15 4. Composición para su uso según la reivindicación 3, en la que dicha fracción de membrana celular de planta se obtiene de trébol, colza, remolacha azucarera, diente de león, *Arabidopsis thaliana*, maíz, tabaco, girasol, lechuga, *Chenopodium*, *Atriplex*, espinaca y hierbas o una mezcla de los mismos.
- 20 5. Composición para su uso según la reivindicación 4, en la que dicha fracción de membrana celular de planta se obtiene de espinaca.
6. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha composición comprende al menos la parte transmembrana de una proteína de membrana celular, en la que dicha parte transmembrana comprende residuos de aminoácido hidrófobos.
- 25 7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende al menos un péptido hidrófobo de membrana celular que tiene desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 residuos de aminoácido.
- 30 8. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende dos o más péptidos hidrófobos que se derivan de la misma proteína o proteínas diferentes.
- 35 9. Composición para su uso según la reivindicación 7, en la que dicho péptido hidrófobo tiene 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 residuos de aminoácido.
- 40 10. Composición para su uso según la reivindicación 7 ó 9, en la que dicho péptido hidrófobo es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 45 11. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha membrana celular o partes de la misma tienen una distribución de tamaño de 0,1 µm a aproximadamente 5 µm.
- 50 12. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 7, 9 ó 10, en la que dicho péptido hidrófobo comprende desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 residuos de aminoácido adicionales.
- 55 13. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende además un portador, diluyente, excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable.
- 60 14. Composición para su uso según la reivindicación 13, en la que dicha composición farmacéutica son gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, jarabes o emulsiones.
- 65 15. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha composición es una composición alimenticia.
16. Composición para su uso según la reivindicación 15, en la que dicha composición es sólida, semisólida o está en una forma líquida.
17. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición está secada por congelación, secada por pulverización o liofilizada.
18. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en la que dicha composición es un ingrediente en margarina, aceite, nata, leche, queso, *brie*, harina, zumo, refresco o producto de té.
19. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 15 a 18, en el que dicha composición consiste en dicha fracción de membrana celular.
20. Uso no terapéutico de una composición que comprende una fracción de membrana celular obtenida de una planta o alga, comprendiendo dicha fracción al menos una membrana celular de un cloroplasto o un tilacoide, o partes de los mismos, para suprimir el apetito y/o para disminuir el peso corporal.

21. Uso no terapéutico según la reivindicación 20, para suprimir el apetito.
- 5 22. Uso no terapéutico según la reivindicación 20 ó 21, en el que dicha composición consiste en dicha fracción de membrana celular.
23. Uso no terapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que dicha composición se usa como aditivo alimentario.
- 10 24. Uso no terapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en el que dicha composición comprende al menos la parte transmembrana de una proteína de membrana celular, en el que dicha parte transmembrana comprende residuos de aminoácido hidrófobos, dicha composición comprende al menos un péptido hidrófobo de membrana celular que tiene desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25
- 15 residuos de aminoácido, y dicha composición comprende dos o más péptidos hidrófobos que se derivan de la misma proteína o proteínas diferentes.

FIG 1/4

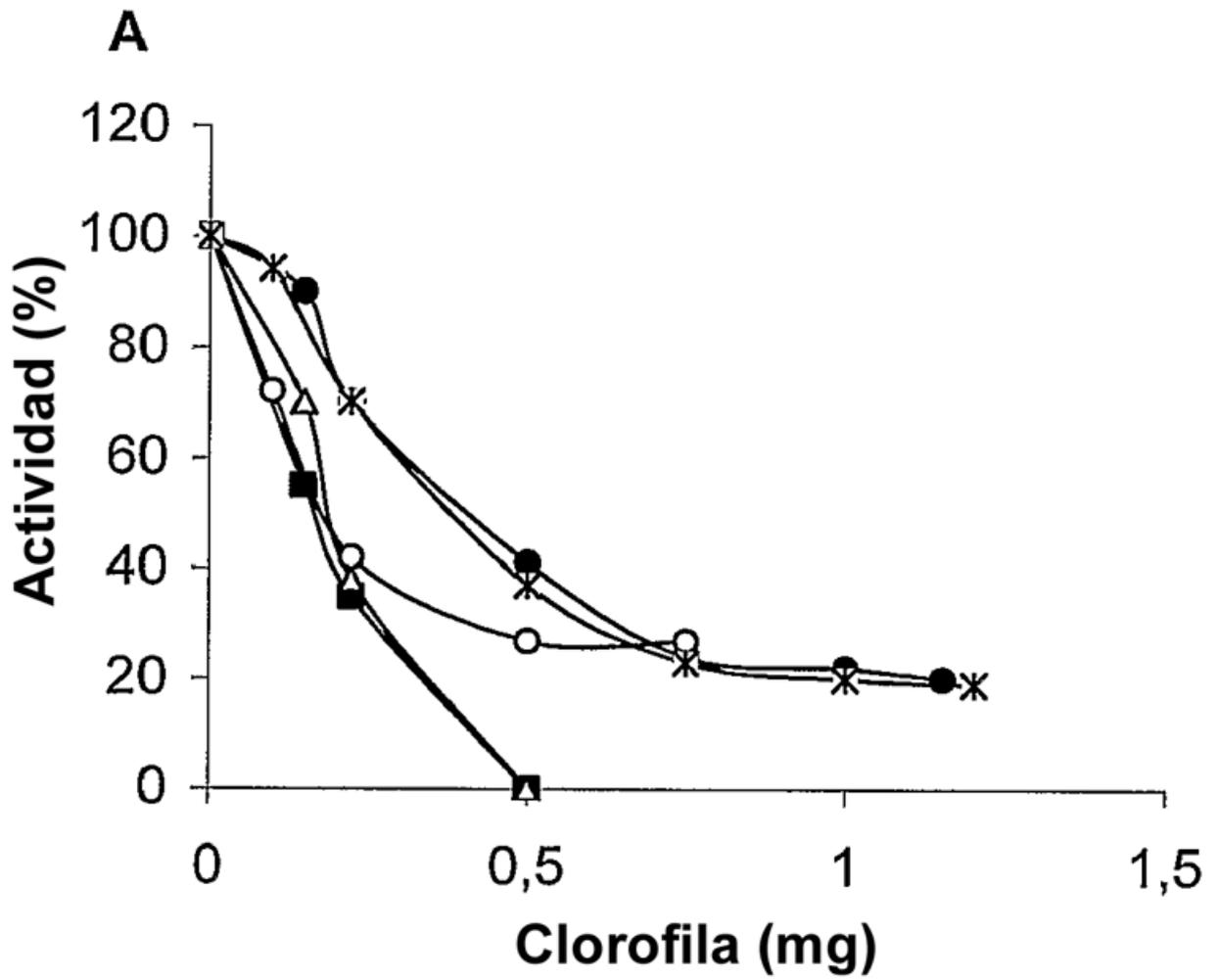


Fig 2/4

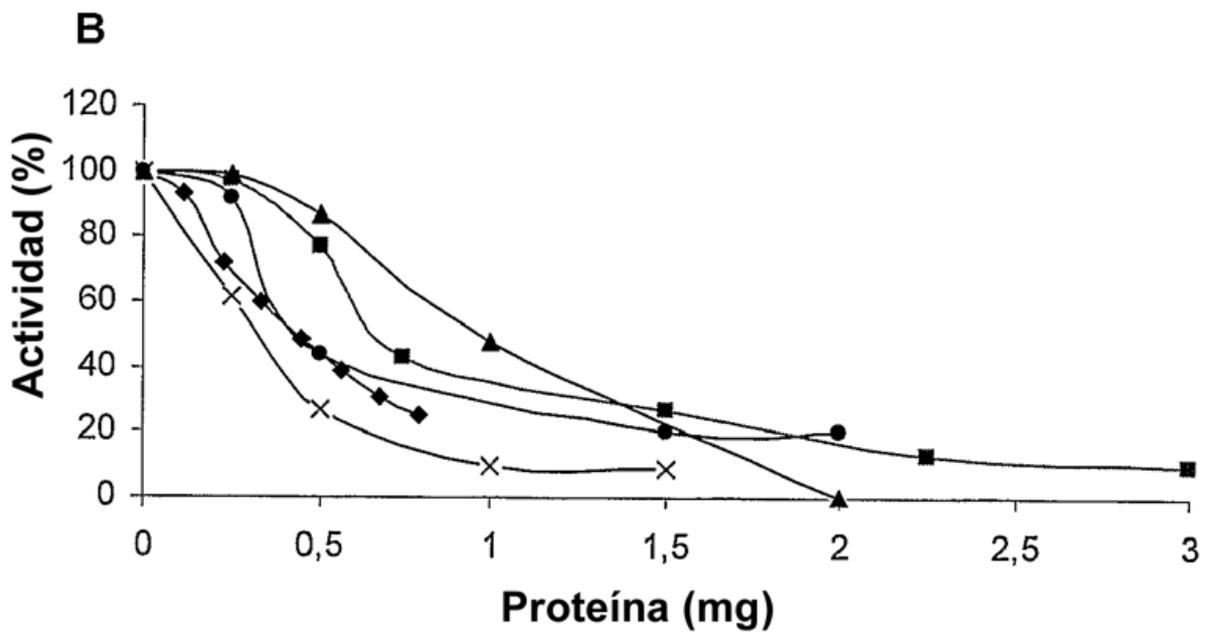


Fig 3/4

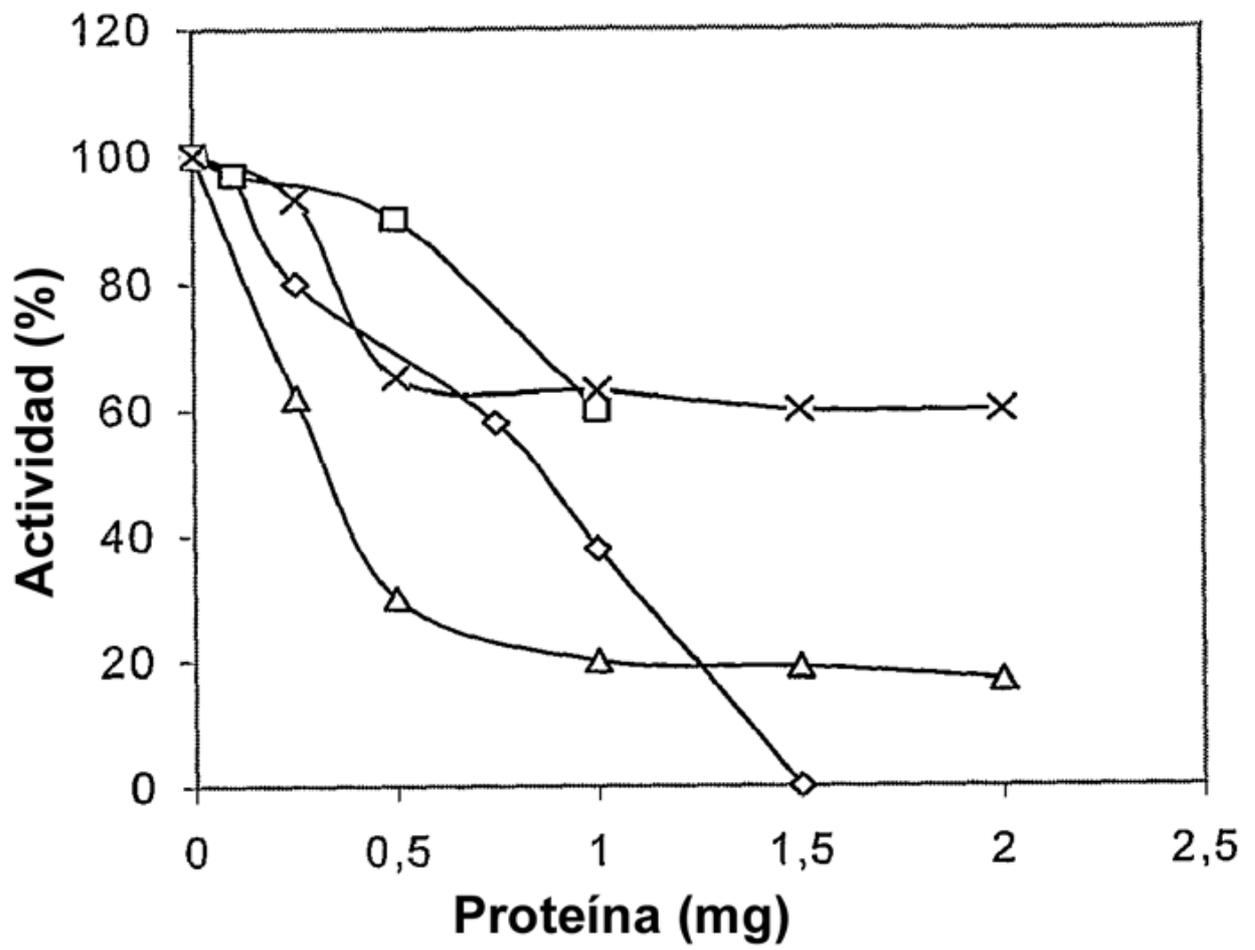


Fig 4/4

