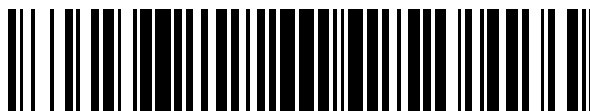


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 774**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 3/06 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2003 E 17158099 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3189845**

54 Título: **Preparación para la reducción del colesterol, suplemento alimenticio y producto alimenticio, y métodos para su elaboración**

30 Prioridad:

12.12.2002 NL 1022153

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

26.10.2020

73 Titular/es:

EZCOL B.V. (100.0%)

Reutsedijk 9

5264 PC Vught, NL

72 Inventor/es:

EMEIS, JOSEPHUS JAN y

LASSEUR, CHRISTOPHE ANDRE ANTOINE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 789 774 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación para la reducción del colesterol, suplemento alimenticio y producto alimenticio, y métodos para su elaboración

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a preparaciones para reducir el colesterol, en particular a una preparación bacteriana para su uso como medicamento para reducir los niveles de colesterol en el plasma sanguíneo. La invención se refiere además a una preparación farmacéutica que comprende una preparación de *Rhodospirillum spp* y uno o más excipientes para su uso en la reducción del colesterol en plasma. También se describen un suplemento alimenticio que contiene esta preparación, un producto alimenticio que contiene este suplemento alimenticio y métodos para su preparación.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La enfermedad cardiovascular es causada por una serie de factores sinérgicos, de los cuales el más importante es un nivel de colesterol en sangre demasiado alto. El colesterol es un componente esencial para las células animales y humanas, ya que es un componente de las membranas celulares. Las células humanas pueden sintetizar su propio colesterol, pero el colesterol también se asimila a partir de los alimentos. Ambos procesos desempeñan una función importante en el metabolismo del colesterol.

[0003] Además de su papel biológico esencial como componente para las membranas celulares, el colesterol también tiene efectos negativos en la salud humana, como causa de enfermedades cardiovasculares (como, por ejemplo, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica), más específicamente en relación con la aparición de lesiones ateroscleróticas en la pared de los vasos sanguíneos. Un nivel elevado de colesterol en plasma es el factor de riesgo predictivo más importante para la aparición de enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis.

[0004] En el plasma sanguíneo, el colesterol se transporta en las llamadas lipoproteínas, que se pueden subdividir en varias clases diferentes según su diámetro y densidad específica. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) constituyen las clases más importantes de lipoproteínas.

[0005] Los estudios experimentales y clínicos han demostrado que la cantidad de colesterol transportado en las clases de lipoproteínas VLDL, IDL y LDL (el llamado colesterol proaterogénico) es un factor de riesgo para la aparición de enfermedades cardiovasculares. El colesterol transportado en partículas de HDL, por el contrario, protege contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (colesterol antiaterogénico).

[0006] Los estudios clínicos prospectivos aleatorizados controlados con placebo han demostrado que la reducción del colesterol en plasma tiene un efecto favorable sobre la incidencia de enfermedades cardiovasculares y sobre la mortalidad. Sin embargo, un requisito previo es que la reducción del colesterol se deba a una reducción del colesterol proaterogénico presente en VLDL, IDL y LDL.

Por lo tanto, para el tratamiento y la prevención de enfermedades cardiovasculares es imprescindible reducir el colesterol proaterogénico y aumentar, en proporción absoluta o relativa, el colesterol antiaterogénico. Existen varios enfoques para reducir el colesterol en plasma. Los más importantes son:

- inhibir la biosíntesis del colesterol;
- aumentar la eliminación del colesterol (y/o sus metabolitos, específicamente los ácidos biliares) de los tejidos hacia la luz intestinal;
- reducir la absorción de colesterol y ácidos biliares del tubo digestivo.

[0007] Los medicamentos que actualmente se usan para inhibir la síntesis de colesterol suelen ser inhibidores de la enzima hidroximetil-glutaril-coenzima A reductasa (HMGCoA reductasa), la enzima limitante de la velocidad en la vía de síntesis del colesterol. Estas llamadas "estatinas" son moléculas que inhiben competitivamente la acción enzimática. Ejemplos de estas son la simvastatina ("Zocor®"), la pravastatina ("Pravachol®") y la atorvastatina ("Lipitor®"). Las estatinas son generalmente derivados sintetizados químicamente de metabolitos fúngicos naturales.

[0008] Para aumentar la eliminación del colesterol, se puede utilizar una resina que adsorbe ácidos biliares (por ejemplo, colestiramina, "Questran®"). Debido a la adsorción de ácidos biliares a la resina, aumenta su secreción en las heces y se reduce su reabsorción desde el intestino hacia la sangre, lo que resulta en una pérdida relativa de ácidos biliares del cuerpo. En consecuencia, el hígado aumenta la conversión de colesterol en ácidos biliares, lo que resulta en un aumento neto en la secreción de colesterol (metabolitos) del cuerpo. Debido a que los ácidos biliares (al solubilizar el colesterol) son esenciales para la absorción de colesterol desde la luz hacia el tejido

intestinal, una reducción en el contenido de ácidos biliares en la luz intestinal también dará como resultado una disminución en la absorción de colesterol.

[0009] Los medicamentos que inhiben el transporte activo de colesterol desde la luz intestinal a la sangre al inhibir los sistemas de transporte celular para el colesterol (y los esteroides relacionados) en las células epiteliales intestinales todavía están en desarrollo. Uno de estos compuestos ("Ezetimibe®") se ha registrado recientemente en algunos países; otros medicamentos relacionados aún se están probando en ensayos clínicos.

[0010] Además del uso de medicamentos, los objetivos mencionados anteriormente también se pueden alcanzar mediante el uso de compuestos naturales, o de compuestos derivados de productos naturales (Hassel, 1998). Un compuesto similar a las estatinas está presente de manera espontánea en el llamado "arroz rojo", una cepa de arroz que lleva un moho que produce lovastatina. Este metabolito fúngico es idéntico al medicamento para reducir el colesterol "Mevacor®". Otro ejemplo es la presencia, en las plantas, de los llamados fitosteroides, que inhiben competitivamente la absorción intestinal de colesterol y ácidos biliares. Los fitosteroides se usan hoy en día como aditivos para reducir el colesterol en las margarinas "Benecol®" y "Becel Pro-actif®".

[0011] La solicitud de patente CN1274584 de Zhongwei Huamei Medicinal Tech. Dev. Co. se refiere a la aplicación de bacterias fotosintéticas, en particular *Rhodospirillum*, como artículo de salud médica y su producción y producto.

[0012] Sin embargo, todavía existe la necesidad de preparaciones para reducir el colesterol, específicamente para su uso en la industria alimentaria, y preferiblemente dirigidas a la alimentación humana.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Sorprendentemente, hemos descubierto que la adición de una preparación liofilizada de *Rhodospirillum rubrum* (*R. rubrum*) al pienso de animales de laboratorio reduce considerablemente el nivel de colesterol en sangre de estos animales.

[0014] En un primer aspecto, la invención proporciona una preparación de *Rhodospirillum* spp. para su uso en la reducción del colesterol en plasma, donde dicha preparación comprende *Rhodospirillum* spp. muerta, o *Rhodospirillum* spp. liofilizada. En otro aspecto, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica que comprende una preparación de *Rhodospirillum* spp. y uno o más excipientes para su uso en la reducción del colesterol en plasma, en donde dicha preparación comprende *Rhodospirillum* spp. muerta, o *Rhodospirillum* spp. liofilizada.

[0015] También se describe un agente reductor del colesterol en plasma que comprende una preparación de *Rhodospirillum* spp. (no reivindicado)

[0016] En otro aspecto más, la presente divulgación se refiere al uso de una preparación de *Rhodospirillum* spp. para la producción de un medicamento para reducir el colesterol en plasma (no reivindicado).

[0017] La presente divulgación proporciona en otro aspecto adicional un suplemento alimenticio con propiedades de reducción del colesterol, que comprende una preparación de *Rhodospirillum* spp. (no reivindicado).

[0018] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un probiótico con propiedades de reducción del colesterol que contiene una preparación de *Rhodospirillum* spp. viva (no reivindicado).

[0019] En otro aspecto, la divulgación proporciona un producto alimenticio que comprende el suplemento alimenticio mencionado anteriormente.

[0020] En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para la producción de una preparación de *Rhodospirillum* spp. (no reivindicado), que comprende cultivar una o más células de *Rhodospirillum* spp. en un cultivo multicelular, cosechar dicho cultivo y procesar las células de dicho cultivo en una preparación. Una forma de realización preferida de dicho método comprende el procesamiento de las células de dicho cultivo en una preparación de *Rhodospirillum* spp. viva (no reivindicado).

[0021] En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para la producción de un suplemento alimenticio (no reivindicado), que comprende adecuar para el consumo una preparación de *Rhodospirillum* spp. destinada para su uso como medicamento.

[0022] En otro aspecto (no reivindicado), la divulgación proporciona un método para la producción de un producto alimenticio, que comprende incorporar un suplemento alimenticio en un producto alimenticio.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0023]

La Figura 1 muestra el efecto sobre el colesterol y los triglicéridos en plasma de ratas Wistar alimentadas con un pienso normal, o un pienso que contiene 10 % (p/p) de *R.rubrum*, como se explica en el Ejemplo 2. * significa $p < 0,001$ en relación con los controles.

La Figura 2 muestra el patrón de lipoproteínas en plasma de ratas Wistar alimentadas con una dieta de pienso normal, y de ratas Wistar alimentadas con una dieta de pienso que contiene 10 % (p/p) de *R.rubrum*, como se explica en el Ejemplo 2. (separación por cromatografía líquida rápida de proteínas).

La Figura 3 muestra el efecto sobre el colesterol y los triglicéridos en plasma de ratones C57Bl/6 alimentados con una dieta de pienso normal y una dieta de pienso que contiene 10 % (p/p) de *R.rubrum*, como se explica en el Ejemplo 3. * significa $p < 0,003$ en relación con los controles.

La Figura 4 muestra el efecto sobre el colesterol y triglicéridos en plasma de ratones C57Bl/6 alimentados con una dieta hipercolesterolémica "de tipo occidental" y una dieta hipercolesterolémica "de tipo occidental" que contiene 10 % (p/p) de *R.rubrum*, como se explica en el Ejemplo 4. * significa $p < 0,0003$ en relación con los controles. ** significa $p < 0,011$ en relación con los controles.

La Figura 5 muestra el patrón de lipoproteínas en plasma de ratones C57Bl/6 alimentados con una dieta hipercolesterolémica "de tipo occidental" y una dieta hipercolesterolémica "de tipo occidental" que contiene 10 % (p/p) de *R.rubrum*, como se explica en el Ejemplo 4. (separación por cromatografía líquida rápida de proteínas).

La Figura 6 muestra el efecto de diferentes concentraciones de *R.rubrum* en una dieta "de tipo occidental" con colesterol en plasma después de una y dos semanas, como se explica en el ejemplo 5. * significa significativamente diferente de los controles después de dos semanas ($p < 0,001$ en relación con los controles).

** significa significativamente diferente de 0 % de *R.rubrum* después de una semana ($p < 0,001$ en relación con los controles) (los datos mostrados son medias $\pm$ DE).

La Figura 7 muestra el patrón de lipoproteínas de ratones APOE3*Leiden alimentados con una dieta hipercolesterolémica "de tipo occidental" y que contiene diferentes concentraciones de *R.rubrum*, como se explica en el Ejemplo 5 (separación por cromatografía líquida rápida de proteínas).

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

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0024] *Rhodospirillum* es un género de la familia *Rhodospirillaceae*, una familia de bacterias púrpuras no sulfurosas de la orden *Rhodospirillales* y la clase Alpha-proteobacteria. Las *Rhodospirillaceae* se caracterizan, entre otras características, por ser fototróficas y crecer tanto aeróbica como anaeróbicamente, utilizando la luz como fuente de energía. Para ese fin, las bacterias contienen clorofila b. Dentro del género *Rhodospirillum* se distinguen tres especies, a saber, *Rhodospirillum rubrum* (Imhoff y Trüper, 1992), *Rhodospirillum centenum* y *Rhodospirillum photometricum*. Además, cuatro especies no están oficialmente reconocidas, a saber, *Rhodospirillum salexigens*, *Rhodospirillum salinarum*, *Rhodospirillum sodomense*, y *Rhodospirillum tenue*. En el género *Phaeospirillum*, otro miembro de la familia *Rhodospirillaceae*, se incluyen dos especies: *Phaeospirillum fulvum* y *Phaeospirillum molischianum*. (Para la nomenclatura, véase Imhoff *et al* (1998); Euzéby (2003); y la referencia 1).

[0025] La *Rhodospirillum rubrum* se encuentra, entre otros, en aguas naturales, en lodo y en plantas de tratamiento de aguas residuales. La bacteria se utiliza en la purificación de aguas residuales, para la producción de biomasa de alimentos para animales (por ejemplo, como alimento para aves y peces), y como fertilizante. La biomasa de bacterias fototróficas se considera una excelente materia prima para la alimentación animal debido a su alto contenido de vitaminas y aminoácidos.

[0026] El uso de *Rhodospirillum rubrum* como alimento para animales se ha estado practicando durante algún tiempo (Imhoff y Trüper, 1992). Los presentes inventores, sin embargo, han descubierto sorprendentemente que *R.rubrum* puede contribuir de manera importante a la prevención de enfermedades cardiovasculares al reducir el nivel de colesterol en el plasma sanguíneo y/o el suero sanguíneo (sangre).

[0027] Una propiedad de reducción del colesterol se define en este documento como la capacidad de una composición, una preparación, un suplemento alimenticio o un producto alimenticio, cuando se administra al cuerpo de un sujeto de la manera apropiada, para reducir el nivel de colesterol en la sangre de dicho sujeto. Los expertos en la técnica conocen métodos para medir el nivel de colesterol en sangre.

[0028] Una preparación de *Rhodospirillum* spp. se define en este documento como una cantidad de material celular de *Rhodospirillum* spp. que ha sido procesado de alguna manera. Una preparación de *Rhodospirillum* spp. puede comprender un extracto celular (no reivindicado), o un componente con propiedades de reducción del colesterol aislado de las células (no reivindicado), o un concentrado de células enteras, o un concentrado de fragmentos celulares rotos (no reivindicado). Tal preparación puede comprender preferiblemente la fracción de membrana (no reivindicada). Además, una preparación puede, según la invención, contener *Rhodospirillum* spp. liofilizada, cuyas células aún están vivas y son capaces de reanudar la división celular en circunstancias más favorables.

[0029] Una preparación según la invención puede consistir perfectamente en una especie del género *Rhodospirillum*, pero también se pueden utilizar mezclas de diferentes *Rhodospirillum* spp. como *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum centenum*, *Rhodospirillum tenue*, *Rhodospirillum photometricum*, *Rhodospirillum salexigens*, *Rhodospirillum salinarum*, y/o *Rhodospirillum sodomense*. En la presente invención también están abarcadas combinaciones de *Rhodospirillum* spp. y *Phaeospirillum* spp.

[0030] Preferiblemente, una preparación de *Rhodospirillum* spp. comprende *Rhodospirillum rubrum*, aún más preferiblemente la especie tipo *Rhodospirillum rubrum* cepa ATCC 11170 (cepa DSM 467) o cepa ATCC 25903. (ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

[0031] Una preparación de *Rhodospirillum* spp., puede contener 20-100 % (p/p), preferiblemente 40-100 % (p/p), incluso más preferiblemente 60-100 % (p/p), y óptimamente 80-100 % (p/p) de material celular de *Rhodospirillum* spp., donde dicho material celular es preferiblemente células enteras liofilizadas. Además, una preparación puede contener otros componentes, dependiendo de la forma en que se preparará la preparación seleccionada (no reivindicada). Por ejemplo, una preparación puede contener agua o, en el caso de una preparación liofilizada, glicerina o sacarosa.

[0032] En una forma de realización preferida (no reivindicada), una preparación liofilizada de *Rhodospirillum* spp. se mezcla con materiales de relleno como celulosa microcristalina (CCM) o manitol, con un aglutinante como hidroxipropilcelulosa (HPC) y/o lubricantes, como ácido esteárico y/u otros excipientes, y se granula como un polvo seco, o se prepara para la aplicación de otra manera diferente.

[0033] Tal preparación de *Rhodospirillum* spp. es muy adecuada para su uso como medicamento o preparación farmacéutica para reducir los niveles de colesterol en plasma, preferiblemente en plasma humano. La preparación también puede contener células muertas de *Rhodospirillum* spp.

[0034] Una preparación puede suministrarse como una preparación fluida que contiene componentes sólidos suspendidos, dispersados o emulsionados en un fluido acuoso. Dicha composición puede usarse directamente como una preparación, o procesarse para convertirla en un suplemento alimenticio en una forma de realización alternativa.

[0035] En la presente divulgación, un suplemento alimenticio se define como una formulación que se puede consumir además de una dieta normal y que contiene componentes que no se producen en una dieta normal, o que se producen en cantidades bajas o en cantidades insuficientes, y de los que se desea un consumo suficiente o aumentado. Preferiblemente, un suplemento alimenticio está compuesto de tal manera que sea adecuado para el consumo humano. En consecuencia, un suplemento alimenticio debe tener preferiblemente una textura, sabor y olor, pero también un valor nutricional que lo haga adecuado para el consumo humano.

[0036] En formas de realización de la presente invención, un suplemento alimenticio con propiedades de reducción del colesterol comprende una preparación de *Rhodospirillum* spp. (no reivindicado).

[0037] Un suplemento alimenticio puede contener adecuadamente del 0,1 al 99,9 % (p/p) de una preparación de *Rhodospirillum* spp. Preferiblemente, un suplemento alimenticio contiene del 10 % al 90 % (p/p), incluso más preferiblemente del 30 al 75 % (p/p), de una preparación de *Rhodospirillum* spp.

[0038] Para hacer que un suplemento alimenticio que comprenda una preparación de *Rhodospirillum* spp. sea adecuado para el consumo, se pueden agregar componentes para mejorar, por ejemplo, la textura, el sabor o el olor. En consecuencia, un suplemento alimenticio puede comprender fuentes (adicionales) de proteínas, carbohidratos y grasas, y vitaminas, minerales, electrolitos, oligoelementos y otros componentes adecuados, de modo que el suplemento alimenticio pueda usarse como alimento nutritivo.

[0039] Como fuente de proteínas, todas y cada una de las proteínas que son adecuadas para su uso en formulaciones nutricionales, y sus mezclas, pueden usarse en un suplemento alimenticio. Este tipo de proteínas

abarca, por ejemplo, proteínas animales tales como proteínas de suero, concentrados de proteína de suero, suero en polvo, proteína de huevo, albúmina de huevo, caseína o albúmina de leche, y proteínas vegetales como proteína de soja, harina de soja o proteínas de la leche de soja. Para elegir qué fuente de proteínas utilizar, el valor biológico de una proteína puede constituir un criterio importante. El caseinato, incluido el caseinato de calcio, pero también el suero, la albúmina de la leche, la albúmina del huevo y las proteínas totales del huevo, por ejemplo, son proteínas con un valor biológico muy alto, ya que contienen una gran proporción de aminoácidos esenciales.

[0040] Los carbohidratos adecuados para su uso en un suplemento alimenticio podrían ser, por ejemplo, carbohidratos de cadena corta simples como mono y disacáridos, pero también polisacáridos, o una combinación de ambos. Se puede seleccionar un carbohidrato debido a sus propiedades organolépticas adecuadas. Un carbohidrato complejo puede usarse adecuadamente como fibra alimenticia.

[0041] Un suplemento alimenticio puede contener, en algunas formas de realización, combinaciones de carbohidratos simples y complejos. Como grasa se pueden usar todos los aceites y grasas comestibles.

[0042] Se pueden agregar vitaminas y minerales, de conformidad con las normas de las autoridades sanitarias reguladoras, y pueden abarcar todas las vitaminas y minerales aprobados por las autoridades mencionadas, por ejemplo, vitamina A, B1, B2, B12, C, D, E y K y ácido fólico, niacina, ácido pantoténico y biotina. Como minerales, por ejemplo, se pueden agregar hierro, zinc, yodo, calcio, magnesio, cromo y selenio.

[0043] Los electrolitos como el sodio, el potasio y el cloruro, y los oligoelementos y otros aditivos también pueden formar parte de un suplemento alimenticio. Dichos componentes, si están presentes, se usan preferiblemente en las concentraciones recomendadas. Además, un suplemento alimenticio puede contener componentes que mejoran su textura, colorantes y saborizantes, sustancias aromáticas, especias, rellenos, emulgentes, compuestos estabilizadores, conservantes, antioxidantes, fibras y otros suplementos como aminoácidos, colina, lecitina, ácidos grasos, etc. La elección de dichos componentes dependerá de la formulación, el diseño y las preferencias. Las personas expertas conocen las cantidades de dichos componentes que pueden agregarse, mientras que la elección de las cantidades que se agregarán puede guiarse por las cantidades diarias recomendadas (CDR) para niños y adultos.

[0044] Se pueden agregar emulsionantes para estabilizar el producto final. Ejemplos de emulsionantes aceptables son la lecitina (por ejemplo, la soja o el huevo), y/o los mono y diglicéridos. Como estabilizadores, se pueden utilizar, por ejemplo, la goma garrofin, la goma guar o los carragenanos.

[0045] Se pueden agregar conservantes para aumentar la vida útil del producto. Preferiblemente, se usan conservantes tales como sorbato de sodio, sorbato de potasio, benzoato de potasio, benzoato de sodio o EDTA cálcico disódico.

[0046] Además de los carbohidratos mencionados anteriormente, se pueden agregar edulcorantes naturales o sintéticos, tales como sacáridos, ciclamatos, aspartamina, acesulfamo potásico y/o sorbitol, al suplemento alimenticio.

[0047] Las cantidades de suplemento alimenticio para el consumo pueden variar en tamaño y no están necesariamente restringidas a las dosis mencionadas en las dosis recomendadas. El término "suplemento alimenticio" no está destinado a limitarse a un peso específico, ni a una dosis específica del suplemento alimenticio.

[0048] La composición de un suplemento alimenticio puede, en principio, adoptar cualquier forma adecuada para el consumo humano o animal. En una forma de realización preferida, el suplemento es un polvo seco que es adecuado para ser suspendido, dispersado o emulsionado en un fluido acuoso tal como café, té, caldo o zumo de frutas. Para ese fin, el polvo puede suministrarse en un dispensador.

[0049] En una forma de realización preferida alternativa, el suplemento se formula, a partir de polvo seco, como un comprimido. Para este fin, la composición de un suplemento alimenticio de acuerdo con la invención se puede suministrar adecuadamente con cargas tales como celulosa microcristalina (MCC, por sus siglas en inglés) y manitol, aglutinantes como hidroxipropilcelulosa (HPC), lubricantes como ácido esteárico y otros excipientes.

[0050] También se puede suministrar un suplemento alimenticio como un fluido, en el que los componentes sólidos se han suspendido, dispersado o emulsionado. Dicha composición puede mezclarse directamente en un producto alimenticio o, por ejemplo, puede extraerse y formarse en gránulos u otras formas.

[0051] En una forma de realización alternativa, un suplemento alimenticio puede formularse en forma sólida, tal como una barra, una galleta o un bollo.

[0052] Un suplemento alimenticio se formula preferiblemente para el consumo oral, posiblemente en combinación con un vehículo aceptable como una cápsula, un comprimido, un polvo miscible en agua u otra forma aceptable para la administración, pero también puede procesarse de modo que sea un producto alimenticio.

[0053] Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a formas de producir una preparación, un suplemento alimenticio o un producto alimenticio (no reivindicadas).

[0054] Un método para la producción de una preparación de acuerdo con la divulgación (no reivindicado) puede implicar los pasos necesarios para cultivar células de una o más *Rhodospirillum* spp., para cosechar dicho cultivo y procesar las células de dicho cultivo para producir una preparación.

[0055] Los detalles de tales métodos se describen, entre otros, en los ejemplos mencionados a continuación. La persona experta comprenderá que se pueden usar varios métodos alternativos.

[0056] Durante el cultivo de células de *Rhodospirillum* spp. se aplican condiciones anaeróbicas y fototróficas. Como fuente de carbono se pueden usar varios nutrientes orgánicos. Unos medios de cultivo y condiciones de cultivo muy adecuados para células de *Rhodospirillum* spp. son, por ejemplo, "medio Segers y Verstraete" (Segers y Verstraete, 1983), utilizando ácido láctico (aproximadamente 2,7 gramos/L) como fuente de carbono, a un pH de aproximadamente 6,8-6,9, y a una temperatura de 25-37 °C, preferiblemente adaptado a los requisitos específicos del microorganismo involucrado, a una intensidad de luz constante de, por ejemplo, la iluminación con tubos luminosos (intensidad de luz 300 μM quanta. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y anaeróticamente. Otros medios adecuados para el cultivo de *Rhodospirillum* spp. son, por ejemplo, "medio de *Rhodospirillaceae* modificado" (medio DSMZ # 27, DMSZ GmbH, Braunschweig, Alemania), o medio Cens (medio DSMZ # 748). Las células son adecuadas para su cultivo a una densidad de 0,01 - 50 mg/mL, preferiblemente 1-5 mg de peso húmedo/mL.

[0057] Las células se pueden cultivar igualmente de manera anaeróbica a 30 °C en matraces de 1 litro que contienen un medio constituido por 3,1 ml/l de solución de DL-lactato al 60 %, 3 g/l de peptona bacteriológica y 3 g/l de extracto de levadura en agua corriente, el pH del medio siendo 6,8, e iluminado con una potencia de radiación fotónica media de 50 μM quanta. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, utilizando 3 lámparas de tungsteno de 40 W. Después de 3 días de cultivo, la densidad óptica a 660 nm fue de 3,5 (1,2 g/kg de peso seco).

[0058] Una vez que las células han alcanzado una densidad celular adecuada, se pueden procesar hasta formar una preparación usando la separación del medio de cultivo o mediante recolección, por ejemplo, por centrifugación o filtración. La masa celular concentrada se puede usar directamente o después de un procesamiento adicional.

[0059] Otros pasos adicionales en el procesamiento del material celular de *Rhodospirillum* spp. para obtener una preparación utilizable podrían incluir, por ejemplo, un paso de lavado, pero también podrían implicar un procesamiento adicional de las células mediante liofilización.

[0060] Un suplemento alimenticio (no reivindicado) puede usarse adecuadamente para reducir la absorción intestinal de colesterol, reduciendo así el nivel de colesterol del plasma sanguíneo.

[0061] Otra forma de realización de la divulgación implica la aplicación de un suplemento alimenticio en un producto alimenticio con propiedades de reducción del colesterol (no reivindicado).

[0062] Un método para preparar un producto alimenticio para reducir el colesterol (no reivindicado) implica la producción de un producto alimenticio que incorpore un suplemento alimenticio. Tal método podría implicar un paso en el que un producto alimenticio se prepara primero de la manera normal, seguido de la adición de una preparación de *Rhodospirillum* spp. al producto alimenticio preparado. Además, es posible agregar una preparación de *Rhodospirillum* spp. al producto alimenticio durante su producción.

[0063] Un producto alimenticio con propiedades de reducción del colesterol contiene característicamente del 0,1 al 20 % (p/p), preferiblemente del 1 al 10 % (p/p), del suplemento alimenticio descrito anteriormente.

[0064] La presente divulgación implica finalmente una preparación de *Rhodospirillum* spp. para su uso en un medicamento para reducir el nivel de colesterol del plasma sanguíneo. Preferiblemente, tal preparación debería involucrar a la especie *Rhodospirillum rubrum*.

[0065] La invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Producción de *Rhodospirillum rubrum*.

[0066] La cepa de *R. rubrum* ATCC 25903 se utilizó para la producción de la biomasa utilizada en los experimentos. Las células liofilizadas se rehidrataron en medio R8AH (medio ATCC 550) y se cultivaron en "medio Segers y Verstraete" (véase anteriormente), usando ácido láctico (2,7 g/L) como fuente de carbono, a pH 6,9 $\pm$ 0,1. El cultivo final de la biomasa utilizada en los experimentos se llevó a cabo en biorreactores de 20 litros, en el mismo medio

de cultivo, a 30 ± 1 °C, pH $6,8 \pm 0,1$, e intensidad de luz constante (iluminación con tubos luminosos; $300 \mu\text{M}$ quanta. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), en condiciones anaeróbicas. Después de cinco días de cultivo, la biomasa (3,4 gramos de peso húmedo/L) se cosechó por centrifugación continua, se almacenó a -40 °C y se liofilizó.

5 Ejemplo 2. Otra forma de producir *Rhodospirillum rubrum*.

[0067] Para examinar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la efectividad de reducir el nivel de colesterol, *R. rubrum* ATCC 25903 también se cultivó anaeróticamente a 30 °C en matraces de 1 litro que contenían un medio constituido por 3,1 ml/l de solución de lactato DL al 60 %, 3 g/l de peptona bacteriológica y 3 g/l de extracto de levadura en agua corriente. El pH del medio fue de 6,8. Los matraces se incubaron en una incubadora (New Brunswick Scientific, modelo G 25) en un agitador magnético (Variomag multipunto HP15). Los matraces se iluminaron con una potencia de radiación fotónica media de $50 \mu\text{M}$ quanta. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, utilizando 3 lámparas de tungsteno de 40W. Después de 3 días de cultivo, la densidad óptica a 660 nm ascendió a 3,5 (1,2 g/kg de peso seco) y las células se cosecharon por centrifugación a 6500 g, se lavaron con agua desmineralizada y se liofilizaron (VirTis freezemobile 24). La *R. rubrum* cultivada de esta manera produjo el mismo efecto sobre los niveles de colesterol en plasma que las células de *R. rubrum* cultivadas como se describe en el Ejemplo 1, que se usaron en la mayoría de los ejemplos.

20 Ejemplo 3. Aplicabilidad de otra cepa de *Rhodospirillum rubrum*.

[0068] Otra cepa de *R. rubrum*, la DSM 467, se cultivó anaeróticamente a 25 °C de la misma manera en el mismo medio descrito para el Ejemplo 2. Las células se cosecharon después de 3 días de cultivo a una densidad óptica a 660 nm de 4,5 (peso seco 1,4 g/kg) y se secaron como se describe para el Ejemplo 2. La cepa DSM 467 produjo el mismo efecto sobre los niveles de colesterol en plasma que la cepa ATCC 25903, que se usó en la mayoría de los ejemplos.

Ejemplo 4. Aplicabilidad de la especie *Phaeospirillum molischianum*. [ejemplo de referencia]

[0069] Otra bacteria fotosintética, *Phaeospirillum molischianum* DSM 120, se cultivó en matraces de 1 litro con medio ATCC 550 a 25 °C en condiciones anaeróbicas como se describe para el Ejemplo 2. Las células se cosecharon después de 3 días de cultivo a una densidad óptica a 660 nm de 4,0 (peso seco 1,2 g/kg) y se secaron como se describe para el Ejemplo 2.

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

[0070] Se alimentó a ratas macho Wistar con un pienso para ratas semisintético, cumpliendo los requisitos nutricionales (como se define en la referencia 9) (Hope Farms, Woerden, Países Bajos). Un grupo de ocho ratas recibió este pienso básico. Un segundo grupo de ocho ratas recibió el mismo pienso, pero en este caso contenía además un 10 % (p/p) de *R. rubrum* liofilizada (en vez de sacarosa). Ambos grupos consumieron aproximadamente la misma cantidad de comida (31 ± 7 gramos/día), y mostraron el mismo aumento en el peso corporal con el tiempo. Después de ocho semanas, todos los parámetros químicos clínicos medidos (glucosa plasmática, ácido úrico, urea, creatinina, GOT, GPT, hematocrito y hemoglobina, y glucosa y proteínas en orina) fueron similares en ambos grupos, excepto el colesterol plasmático y los triglicéridos plasmáticos. El colesterol plasmático fue significativamente menor en el grupo alimentado con la dieta que contenía *R. rubrum* ($1,2 \pm 0,1$ mmol/L vs. $1,6 \pm 0,1$ mmol/L; prueba t, $p < 0,0001$), al igual que los triglicéridos plasmáticos ($0,5 \pm 0,1$ mmol/L vs. $1,4 \pm 0,6$ mmol/L; $p < 0,001$) (Figura 1).

[0071] La separación de las lipoproteínas plasmáticas por cromatografía líquida rápida de proteínas (fplc, sistema ÅKTA de Pharmacia-Amersham) mostró que la disminución del colesterol y los triglicéridos se debió a una disminución de la fracción de LDL plasmática, mientras que la fracción de HDL permaneció sin cambios en los animales alimentados con *R. rubrum* (Figura 2). La disminución del colesterol plasmático inducida por *R. rubrum* se debió específicamente a una disminución del colesterol LDL. Van Vlijmen et al. (1996) y Post et al. (2000) han descrito métodos utilizados para medir el colesterol y los triglicéridos, y para separar las lipoproteínas por fplc.

55 Ejemplo 6. El efecto de *R. rubrum* en ratones alimentados con pienso.

[0072] Se alimentó a diez ratones C57Black/6 con un pienso normal semisintético para ratones durante siete días. Posteriormente, a cinco ratones se les dio el mismo pienso durante otros siete días, mientras que a los cinco ratones restantes se les dio el mismo pienso durante siete días, pero con un 10 % (p/p) de *R. rubrum*. La ingesta de pienso no fue significativamente diferente entre los grupos, y fue de una media de 2,6 - 2,8 gramos/ratón.día. Después de siete días, el nivel de colesterol en plasma fue de $1,52 \pm 0,07$ mmol/L en los ratones alimentados con *R. rubrum*, significativamente más bajo que el nivel de colesterol en plasma en el grupo de control ($1,86 \pm 0,15$ mmol/L; prueba t, $p = 0,003$) (Figura 3). Los niveles de triglicéridos en plasma no cambiaron.

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

[0073] Se alimentó a diez ratones C57Black/6 durante tres semanas con una dieta semisintética, la llamada dieta "de tipo occidental", una dieta que contenía 15 % (p/p) de grasa y 0,25 % (p/p) de colesterol (Nishina et al, 1990). Posteriormente, se alimentó a cinco ratones con la misma dieta durante siete días, mientras que se alimentó a otros cinco ratones con la misma dieta pero con un contenido adicional del 10 % (p/p) de *R.rubrum* (también se agregó algo de colesterol a esta dieta para mantener su contenido de colesterol en 0,25 %). Después de estos siete días, el nivel de colesterol en el grupo de control fue de $3,07 \pm 0,18$ mmol/L, mientras que en el grupo alimentado con la dieta que contenía *R.rubrum* el nivel de colesterol fue de $2,26 \pm 0,21$ mmol/L (prueba t, $p = 0,0003$) (Figura 4). Los triglicéridos plasmáticos no disminuyeron. La separación de las lipoproteínas por fplc mostró que el colesterol LDL prácticamente había desaparecido del plasma de los ratones alimentados con una dieta de tipo occidental que contenía *R.rubrum*, mientras que el colesterol HDL no mostró diferencias entre grupos (Figura 5).

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

[0074] En este experimento se utilizaron ratones a los que se había incorporado el gen humano para la llamada mutación Leiden de la apolipoproteína E3 (APOE*3Leiden) por transgénesis. Debido a este cambio transgénico, estos denominados ratones APOE*Leiden tienen un perfil de lipoproteínas humanizado y son extremadamente adecuados para estudiar el efecto de los compuestos sobre el metabolismo de las lipoproteínas (van Vlijmen et al, 1996; 1998).

[0075] El diseño del estudio fue el siguiente: se alimentó a grupos de ratones durante 5 semanas con una dieta "de tipo occidental" (véase anteriormente) que contenía 0,25 % (p/p) de colesterol. Esta dieta aumentó su nivel de colesterol en plasma a 13-14 mmol/L. Posteriormente, los ratones se aleatorizaron, en función de su nivel de colesterol en plasma, en grupos de seis ratones cada uno. Estos grupos recibieron la misma dieta, pero que contenía además 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5 o 10 % (p/p) de *R.rubrum* liofilizada. El contenido de colesterol de la dieta se mantuvo en 0,25 % agregando colesterol según fuera necesario.

[0076] Durante el experimento se monitorizó el peso corporal y la ingesta de alimento. Después del cambio en la dieta, se extrajo sangre semanalmente para determinar los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma. Además, el patrón de lipoproteínas plasmáticas se determinó en grupo en muestras agrupadas por fplc. Además, las heces se recolectaron semanalmente en grupo. Después de tres semanas, se midió la secreción de VLDL en los grupos alimentados con 0 % y 10 % de *R.rubrum* (experimento terminal). El grupo alimentado con 0,625 % de *R.rubrum* luego se pasó a una dieta que contenía 0 % de *R.rubrum*, el grupo alimentado con 2,5 % de *R.rubrum* se pasó a un 5 % de *R.rubrum*, y el grupo alimentado con 5 % de *R.rubrum* se pasó a un 10 % de *R.rubrum*, para reemplazar a los dos grupos sacrificados. Después de otra semana, de nuevo se tomaron muestras de sangre de los cuatro grupos restantes. Los resultados se pueden resumir de la siguiente manera:

- el nivel de colesterol en plasma se redujo significativamente en los grupos alimentados con 5 % o 10 % de *R.rubrum*
- la reducción del colesterol ya era muy significativa después de una semana en el grupo de 10 % de *R.rubrum* ($p < 0,0001$), y después de dos semanas también en el grupo de 5 % de *R.rubrum* ($p < 0,001$), y permaneció así durante el período de tres semanas (Figura 6)
- este nivel de colesterol más bajo se debió a una disminución del colesterol en las fracciones de VLDL y LDL, mientras que la cantidad de colesterol en las fracciones de HDL no cambió (Figura 7)

[0077] Para decidir si la disminución del colesterol se debía a la inhibición de la síntesis de colesterol, se midió la concentración plasmática de latosterol, un producto secundario de la vía de síntesis del colesterol (Kempen et al, 1988). El nivel plasmático de latosterol no fue significativamente diferente entre los grupos alimentados con 0,5 o 10 % de *R.rubrum*; mientras que, como se ha mencionado anteriormente, el nivel de colesterol en plasma fue significativamente menor en los grupos del 5 % y 10 % (Figura 8). La proporción de latosterol en plasma a colesterol en plasma incluso aumentó significativamente en los ratones alimentados con *R.rubrum* (ANOVA $p < 0,026$). Dado que la concentración (relativa) de latosterol es un buen reflejo de la velocidad de síntesis de colesterol (Kempen et al, 1988), se puede concluir que la disminución del colesterol en plasma en los grupos alimentados con un 5 % y un 10 % de *R.rubrum* no se debieron a una disminución de la velocidad de síntesis del colesterol.

[0078] Los niveles plasmáticos de campoterol y β -sitosterol, dos esteroides que se producen solo en las plantas y, por lo tanto, solo pueden estar presentes en el plasma después de la absorción en los intestinos, disminuyeron significativamente en los grupos alimentados con 5 % o 10 % de *R.rubrum* (Figura 9). Sin embargo, la proporción de la concentración plasmática de β -sitosterol a colesterol no cambió significativamente (ANOVA, $p = 0,26$); tampoco lo hizo la proporción de camposterol en plasma a colesterol (ANOVA, $p = 0,98$). Dado que la concentración plasmática de colesterol está determinada por su velocidad de síntesis y su velocidad de absorción en los intestinos, el hecho de que estas proporciones se mantuvieran similares (camposterol, β -sitosterol; compárese con Miettinen et al, 1990) o aumentaran (latosterol) demuestra que la disminución en la concentración de colesterol en plasma no puede deberse a una disminución en la síntesis de colesterol, sino que debe atribuirse a una disminución en la absorción de esteroides de la luz intestinal.

[0079] La síntesis de VLDL por el hígado (medida según lo descrito por Post et al, 2000) no fue significativamente diferente en el grupo alimentado con 10 % de *R.rubrum*, con respecto al grupo de control (Figura 10a, b). Aunque, después de la inyección de Triton WR1339, las concentraciones plasmáticas de triglicéridos aumentaron más rápidamente en el grupo alimentado con 10 % de *R.rubrum* que en el grupo de control (Figura 10a), esto debería atribuirse a la mayor cantidad de triglicéridos en la fracción de VLDL de los ratones alimentados con *R.rubrum* (Figura 10b), en lugar de a un aumento en la secreción de partículas de VLDL por el hígado.

[0080] La excreción fecal de esteroides neutros (especialmente colesterol) aumentó en los ratones tratados con *R.rubrum* (Figura 11), mientras que la excreción fecal de ácidos biliares también aumentó ligeramente (Figura 12). En consecuencia, la excreción fecal de todos los esteroides en conjunto (esteroides neutros más ácidos biliares) aumentó (Figura 13) (véanse también las Tablas de texto 1a y b).

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

[0081] Cinco gramos de *R.rubrum* liofilizada se suspendieron en 25 ml de agua y se sonicaron en un sonicador Branson B-12 durante un minuto a plena potencia. El sonificado se centrifugó luego a 21 000 rpm, y se separaron el sobrenadante y el sedimento. El sedimento se resuspendió y se volvió a centrifugar. El sedimento y el sobrenadante se mezclaron por separado en la dieta W (descrita anteriormente) que contenía del 0,25 % de colesterol al 10 % (p/p), suponiendo que tanto el sedimento como el sobrenadante fueran equivalentes a 5 gramos de *R.rubrum* liofilizada (es decir, el material de partida). Se alimentó a grupos de seis ratones Leiden APOE3* con la dieta W, o con la dieta W pero que también contenía la masa granulada (membranas), o la dieta W pero que también contenía el material citoplasmático, durante dos semanas. En la semana 2, el colesterol plasmático fue de $15,7 \pm 1,6$ mmol/L en los ratones alimentados con la dieta de control W; en los ratones alimentados con la dieta W que también contenía el material citoplasmático, el colesterol plasmático fue de $14,4 \pm 2,1$ mmol/L; mientras que, en los ratones alimentados con la dieta W que también contenía el material de membrana, el colesterol plasmático fue de $6,7 \pm 0,9$ mmol/L, una reducción significativa del 57 % en relación con el grupo de control (prueba t; $p < 0,001$).

Ejemplo 10. Efecto de *Phaeospirillum molischianum* en el nivel de colesterol plasmático en ratones APOE*3Leiden. [ejemplo de referencia]

[0082] Se alimentó a once ratones APOE*3Leiden con la dieta "de tipo occidental" (véase anteriormente) que contenía 0,25 % (p/p) de colesterol. Esta dieta aumentó su nivel de colesterol en plasma a 9 ± 3 mmol/L. Posteriormente, los ratones se aleatorizaron, en función de su nivel de colesterol en plasma, en grupos de seis ratones cada uno. Los dos grupos recibieron la misma dieta, pero contenían además 0 o 10 % (p/p) de *Phaeospirillum molischianum* liofilizada, como se ha descrito anteriormente para *R.rubrum*. Después de diez días de alimentación, el colesterol plasmático fue de una media de 10 ± 4 mmol/L en el grupo al que no se administró *P. molischianum* (prueba t pareada: no significativa), y 5 ± 2 mmol/L en el grupo que recibió 10 % de *P. molischianum* en la alimentación (prueba t pareada: $p < 0,05$).

En resumen:

[0083] Estos experimentos muestran que agregar 5 % (p/p) o 10 % (p/p) de *R.rubrum* a una dieta "de tipo occidental" reduce, en ratones APOE*3Leiden, los niveles de colesterol en plasma de manera significativa. Esta disminución

1. puede atribuirse completamente a una disminución del colesterol transportado en partículas de VLDL y LDL (proaterogénico), mientras que el colesterol HDL (antiaterogénico) permanece sin cambios;
2. no es causada por una disminución en la síntesis de colesterol, ya que los niveles plasmáticos de colesterol no cambian, mientras que la síntesis/secreción de VLDL por el hígado tampoco cambia;
3. no se debe a una mayor excreción de ácidos biliares, que solo se ve incrementada ligeramente; sino que,
4. por lo tanto, lo más probable es que se deba a una disminución de la absorción de esteroides en los intestinos, como lo refleja el aumento de la excreción de colesterol en las heces (véase tabla de texto 1a), y la disminución en las concentraciones plasmáticas de campesterol y β -sitosterol.
5. es causada por material de la membrana celular, no por material celular citoplasmático soluble.

[0084] El efecto de reducción del colesterol es causado por *R.rubrum* cultivada en diferentes condiciones, es causado por al menos dos cepas diferentes de *R.rubrum* (ATCC 25903 y DSM 467), y también es causado por una especie relacionada, *P. molischianum*.

Tabla de texto 1a**Balance de esteroides**

en ratones APOE*3 Leiden alimentados con una dieta "de tipo occidental", que contenía 0,25 % (p/p) de colesterol y cantidades variables de *R.rubrum*

Concentración de <i>R.rubrum</i> en la dieta (% p/p)	ENTRADA de colesterol en los alimentos consumidos (a)	SALIDA de esteroides excretados en las heces (b)	SALIDA de ácidos biliares excretados en las heces	SALIDA total excretada en las heces
0	78	38	14	52
0,625	78	41	18	59
1,25	78	52	17	69
2,5	78	48	15	63
5	78	63	17	80
10	78	68	25	93

Todos los datos se expresan como μ moles por 100 gramos de ratón por día.

Tabla de texto 1b**Absorción intestinal de colesterol**

en ratones APOE*3 Leiden alimentados con una dieta "de tipo occidental", que contenía 0,25 % (p/p) de colesterol y cantidades variables de *R.rubrum*

Concentración de <i>R.rubrum</i> en la dieta (% p/p)	Colesterol absorbido (μ moles por 100 gramos de peso corporal por día) [(a) menos (b)]	Colesterol absorbido (como % de entrada)	Colesterol absorbido (como % del grupo control)
0	40	51	100
0,625	37	48	93
1,25	26	33	64
2,5	30	38	75
5	15	19	37
10	10	12	24

(a) y (b) se refieren a la Tabla de texto 1a.

5 Referencias

[0085]

1. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Bacterial nomenclature up-to-date. Accessed December 6th, 2003. <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>.
2. Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature. Accessed December 6th, 2003. <http://www.bacterio.cict.fr/q/r/rhodospirillum.html> and <http://www.bacterio.cict.fr/q/r/phaeospirillum.html>.
3. Hassel CA. Animal models: new cholesterol raising and lowering nutrients. Curr Opin Lipidol 1998; 9:7-10.
4. Imhoff JF, Trüper HG. The genus Rhodospirillum and related genera. Chapter 101 in: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Springer-Verlag, New York/Berlin/Heidelberg, Volume III, 2nd edition 1992, pp. 2141-2155.
5. Imhoff JF, Petri R, Suling J. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic non-sulfur bacteria of the alpha-Proteobacteria: description of the new genera Phaeospirillum gen.nov., Rhodovibrio gen.nov., Rhodothalassium gen.nov. and Roseospira gen.nov. as well as transfer of Rhodospirillum fulvum to Phaeospirillum fulvum comb.nov., of Rhodospirillum molischianum to Phaeospirillum molischianum comb.nov., of Rhodospirillum salinarum to Rhodovibrio salexigens. Int J System Bacteriol 1998; 48: 793-798.

6. Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA, Katan MB. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans.
J Lipid Res 1988; 29: 1149-1155.
- 5 7. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesäniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population.
Am J Epidemiol 1990; 131: 20-31.
8. Nishina PM, Verstuyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse.
J Lipid Res 1990; 31: 859-869.
- 10 9. Nutrient Requirements of Laboratory Animals.
National Academy of Sciences publication #10, 3rd revised edition.
Washington DC, 1978.
- 10 Post SM, de Roos B, Vermeulen M, Afman L, Jong MC, Dahlmans VEH, Havekes LM, Stellaard F, Katan MB, Princen HMG. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1551-1556.
- 15 11. Segers L, Verstraete W. Conversion of organic acids to H₂ by Rhodospirillaceae grown with glutamate or dinitrogen as nitrogen source.
Biotechnol Bioeng 1983; 25: 283-2853.
- 20 12. Van Vlijmen BJM, van 't Hof HB, Mol MJTM, van der Boom H, van der Zee A, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. Modulation of very low density lipoprotein production and clearance contributes to age and gender-dependent hyperlipoproteinaemia in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice.
J Clin Invest 1996; 97: 1184-1192.
- 25 13. Van Vlijmen BJ, Pearce NJ, Bergo M, Staels B, Yates JW, Gribble AD, Bond BC, Hofker MH, Havekes LM, Groot PH. Apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice as a test model for hypolipidaemic drugs.
Arzneimittelforschung 1998; 48:396-402.

REIVINDICACIONES

1. Preparación de *Rhodospirillum spp.* para su uso en la reducción del colesterol en plasma, donde dicha preparación comprende *Rhodospirillum spp.* muerta o *Rhodospirillum spp* liofilizada.

5

2. Preparación farmacéutica que comprende una preparación de *Rhodospirillum spp* y uno o más excipientes para su uso en la reducción del colesterol en plasma, en donde dicha preparación comprende *Rhodospirillum spp.* muerta o *Rhodospirillum spp* liofilizada.

10

Fig. 1

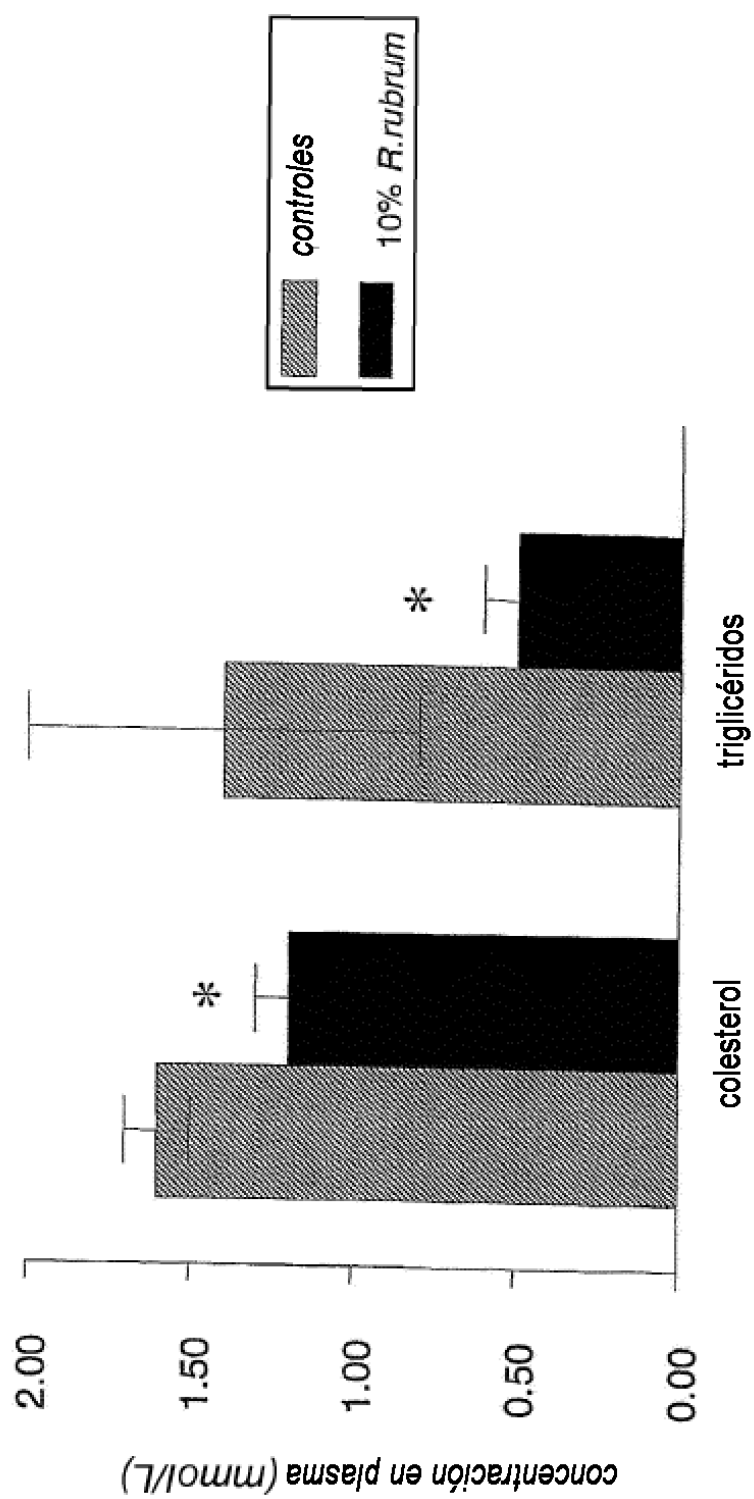


Fig. 2

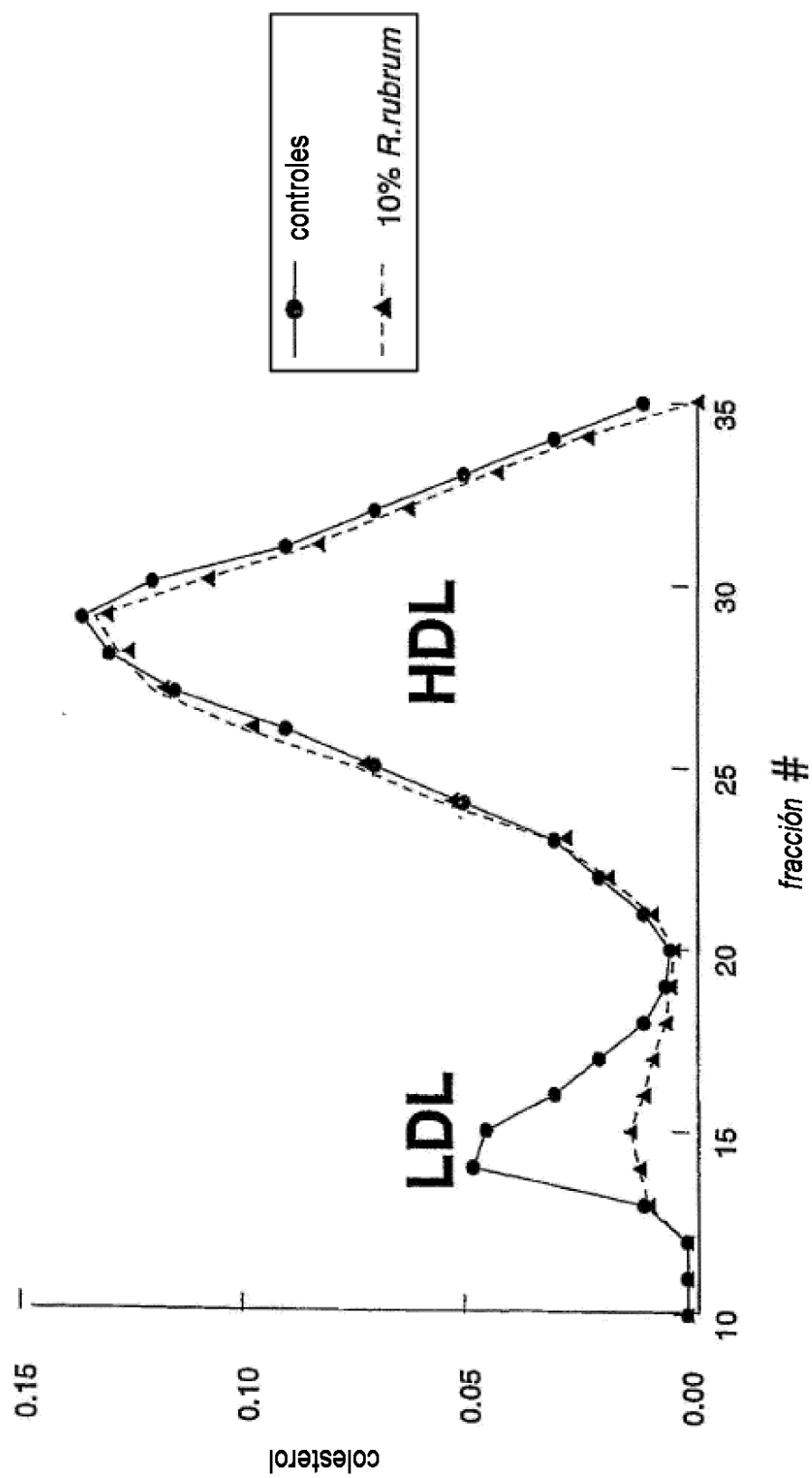


Fig. 3

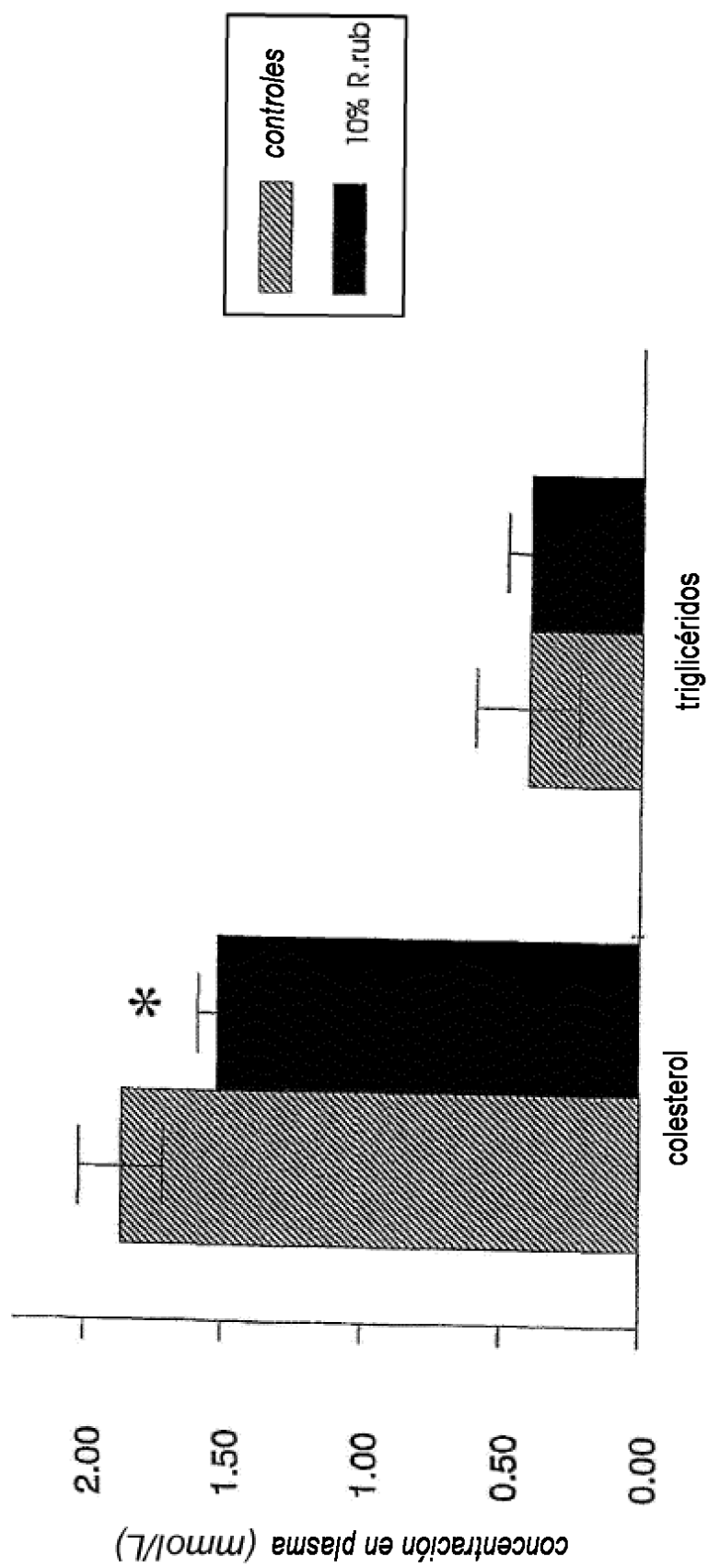


Fig. 4

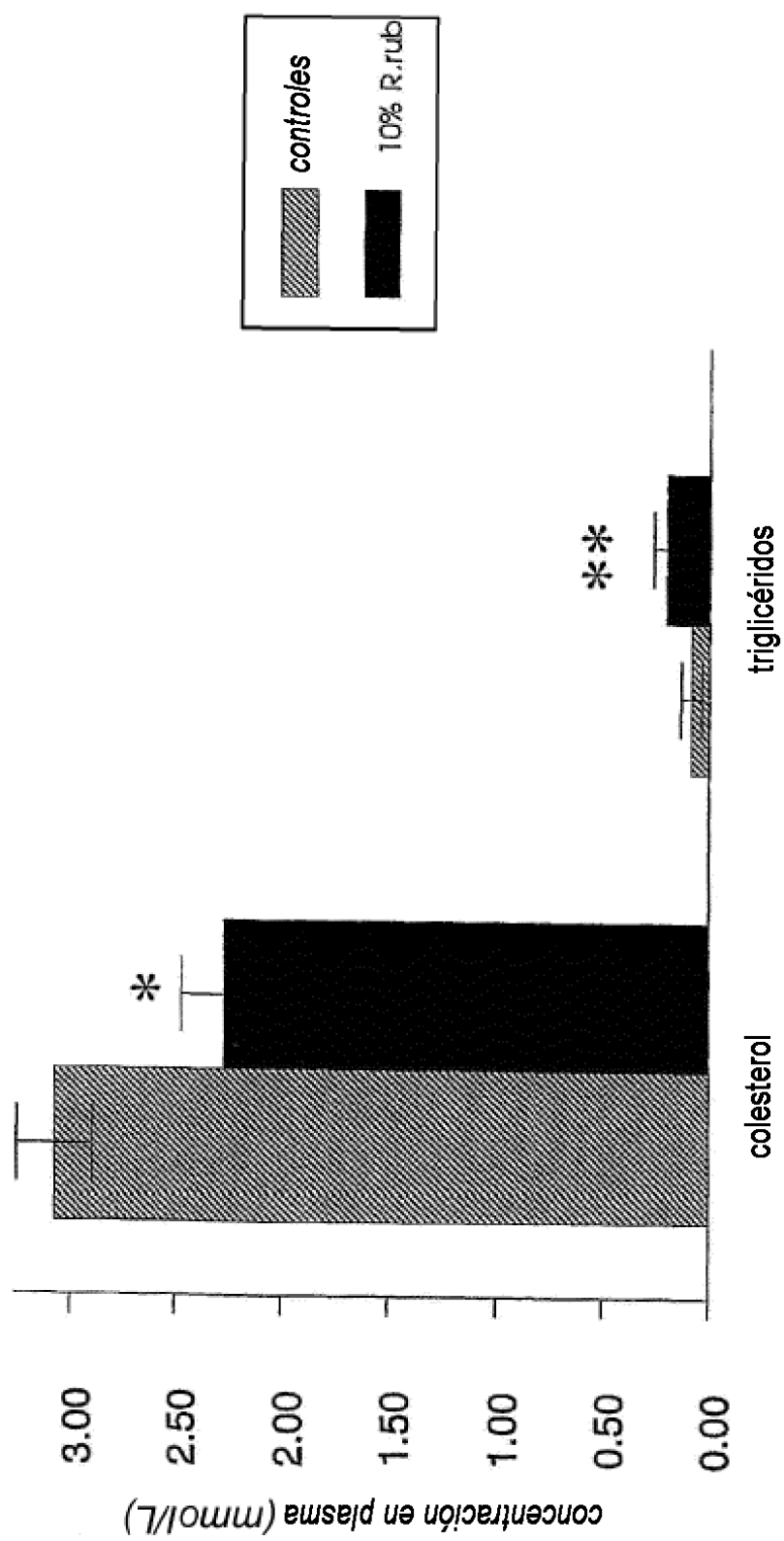


Fig. 5

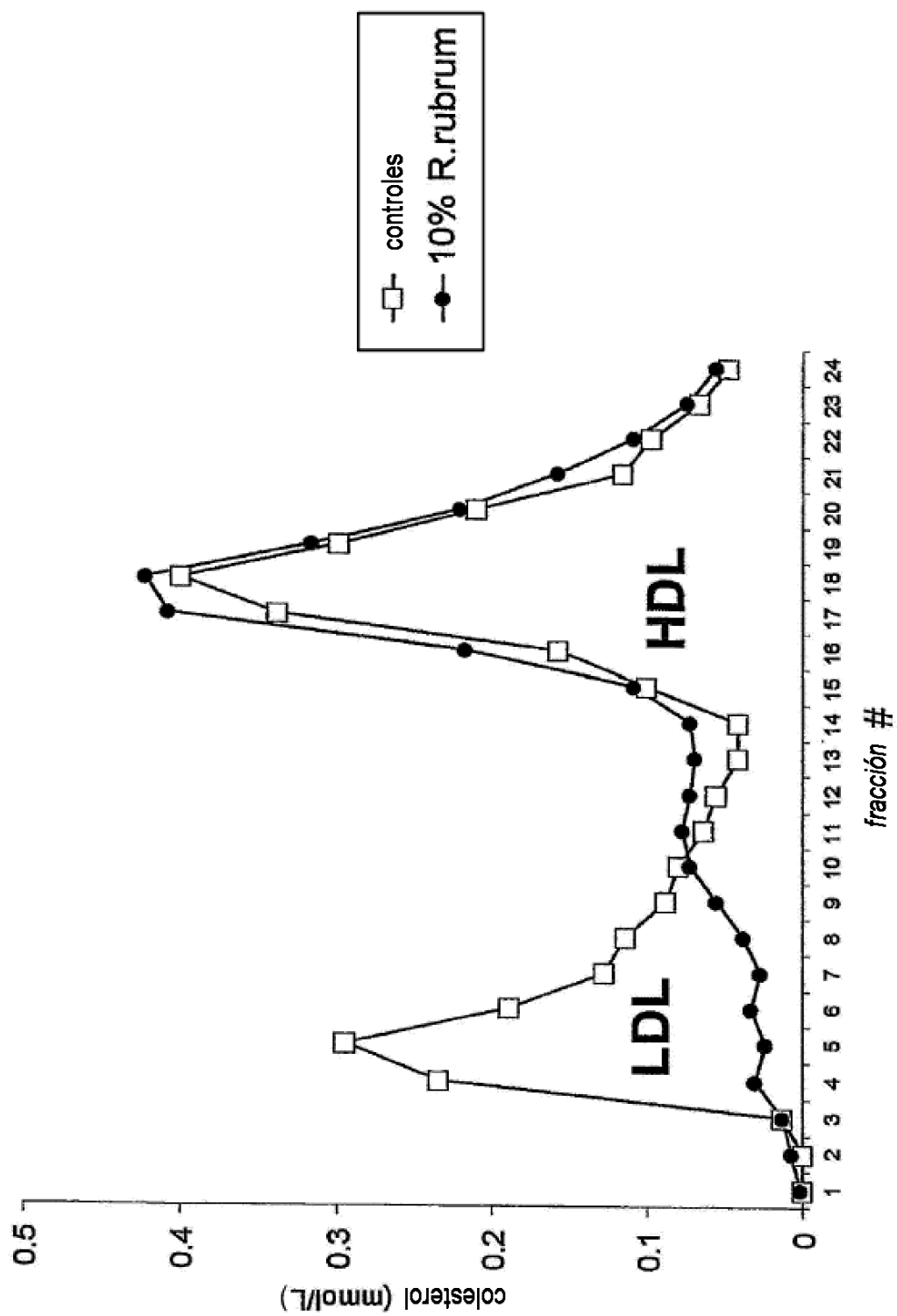


Fig. 6

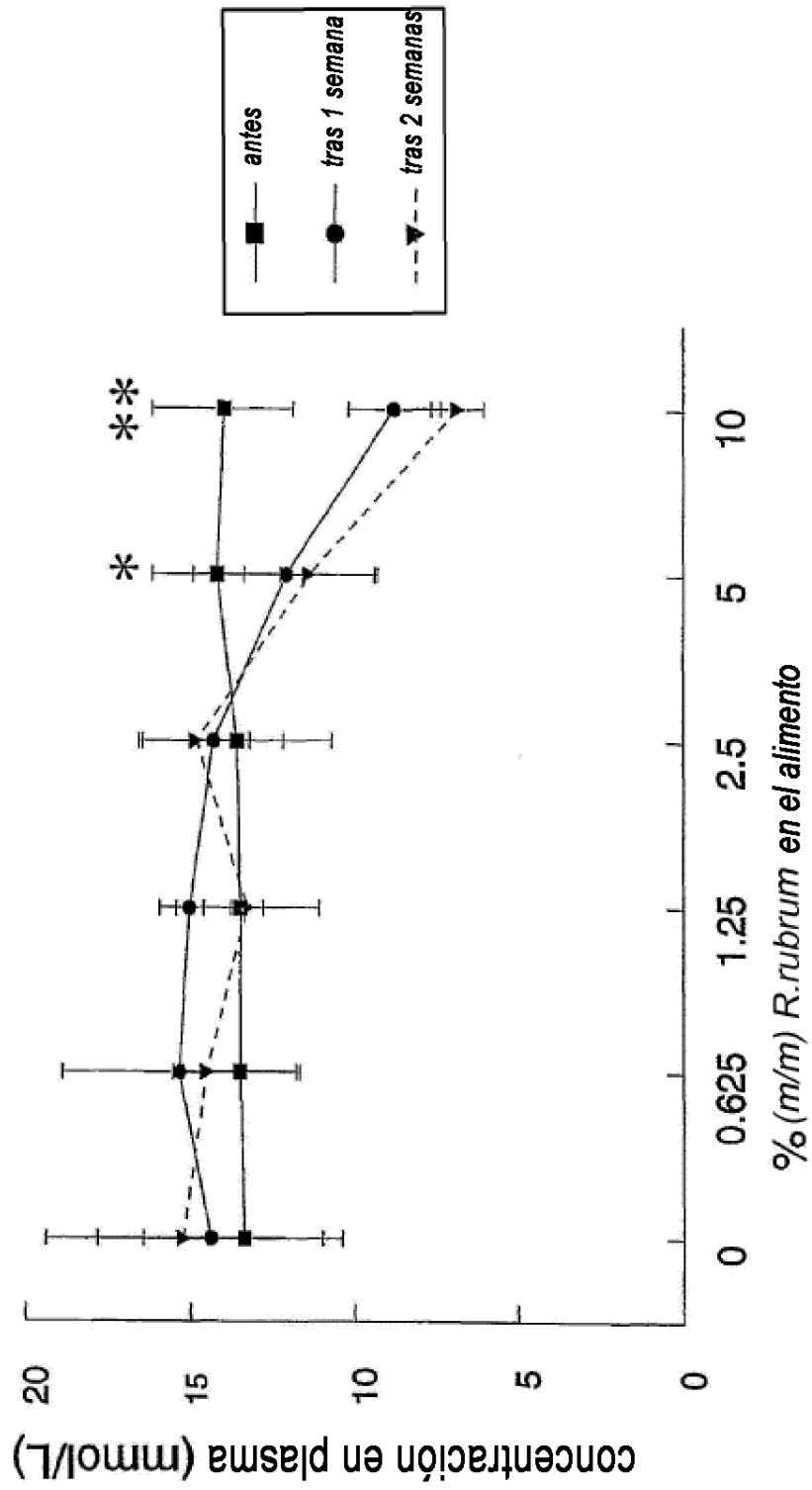


Fig. 7

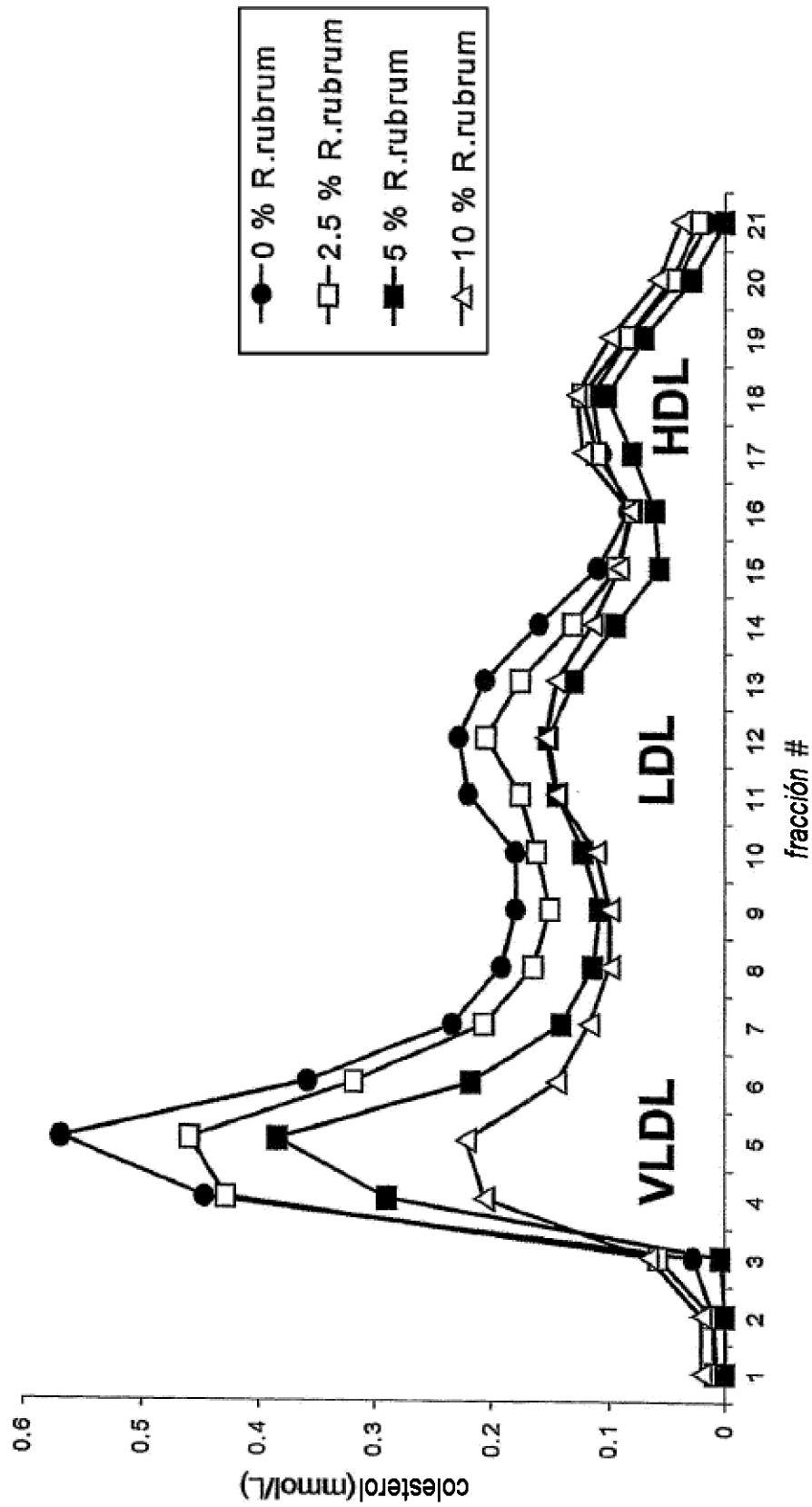


Fig. 8

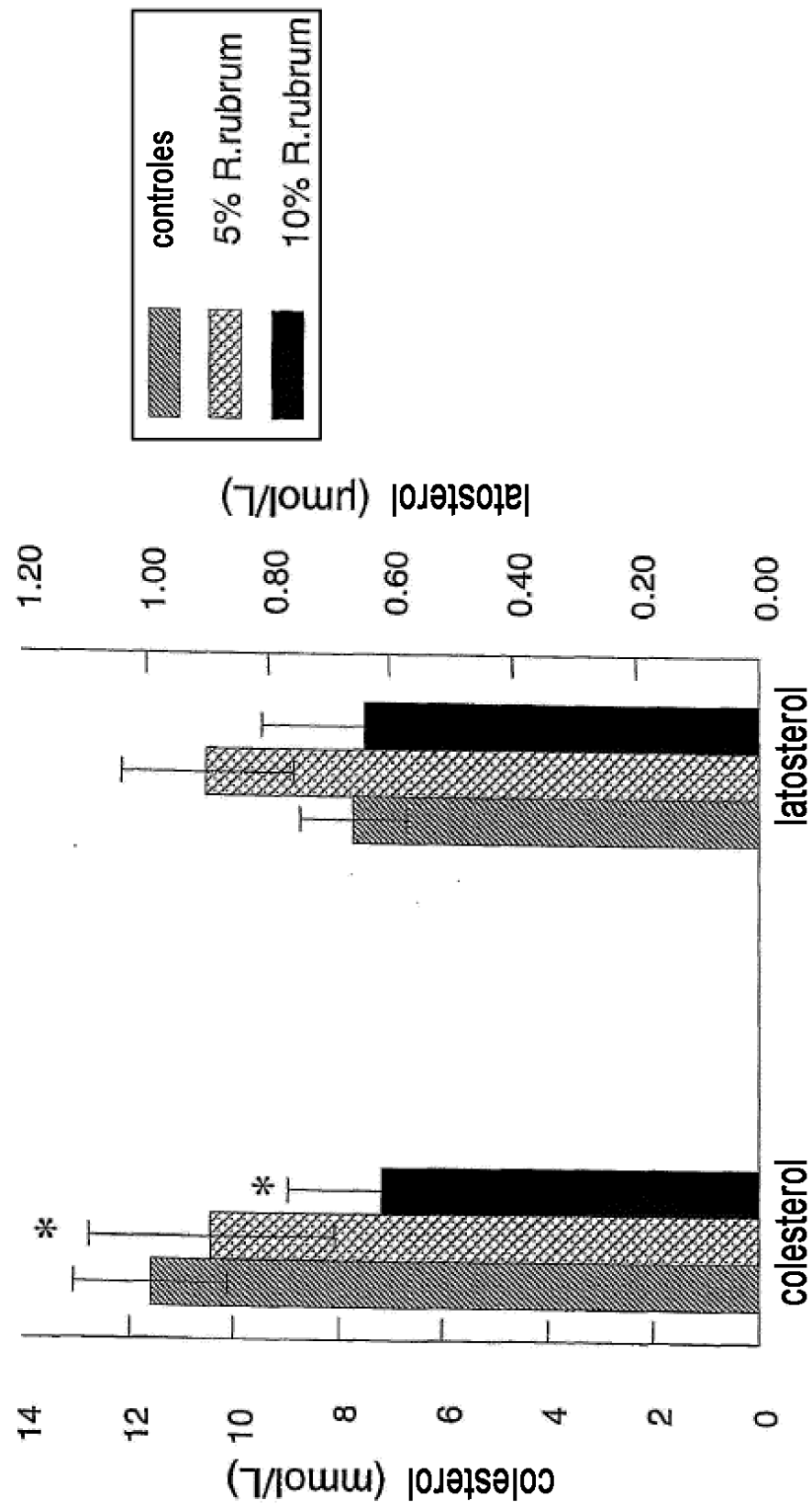


Fig. 9

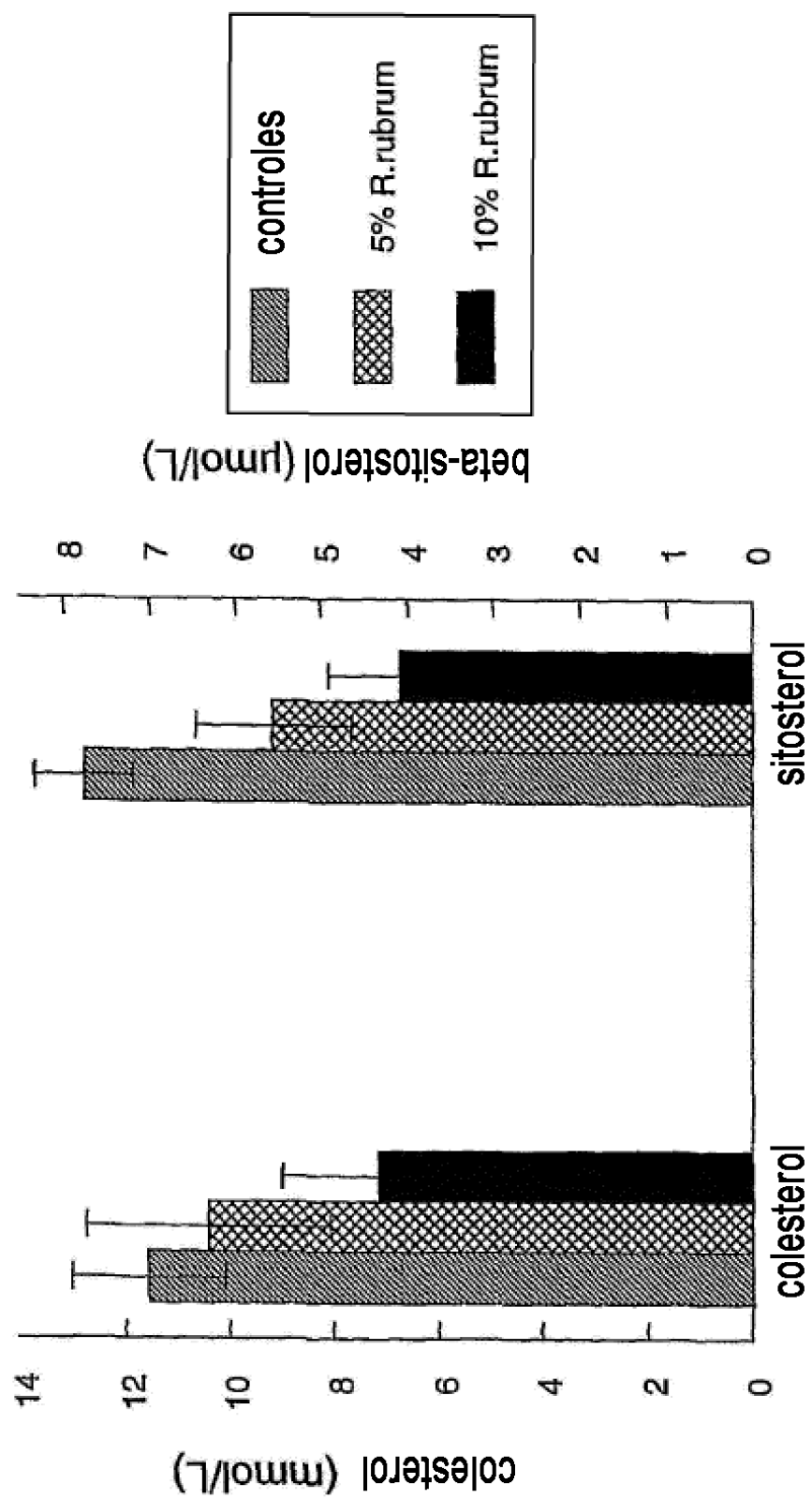


Fig. 10A

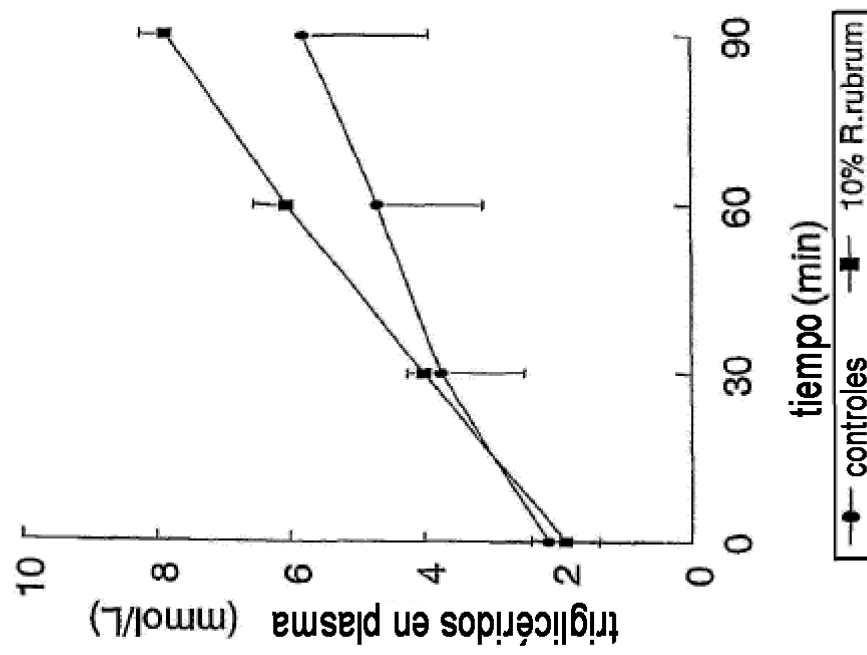


Fig. 10B

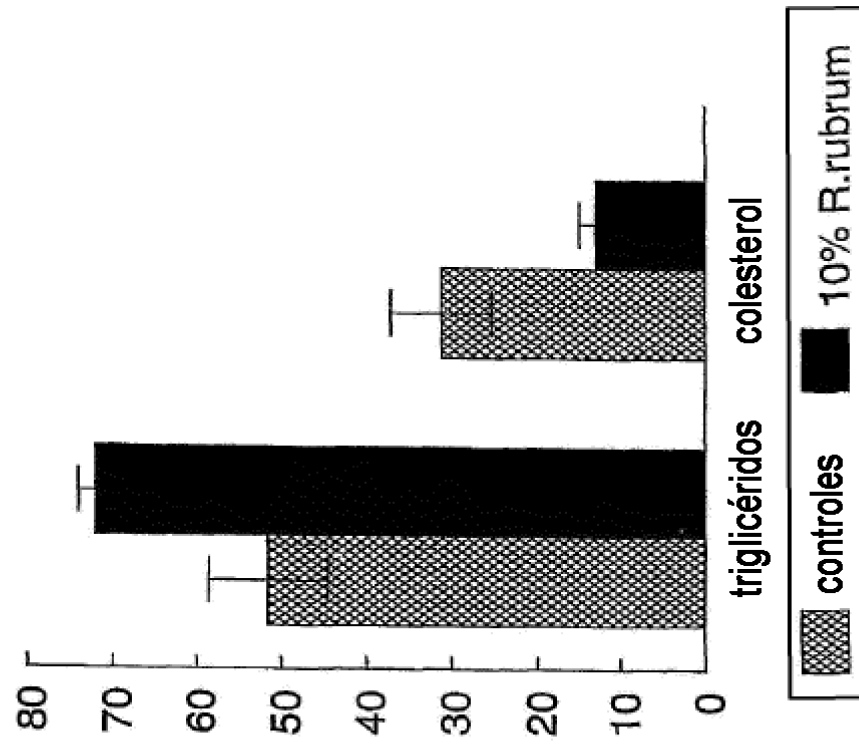
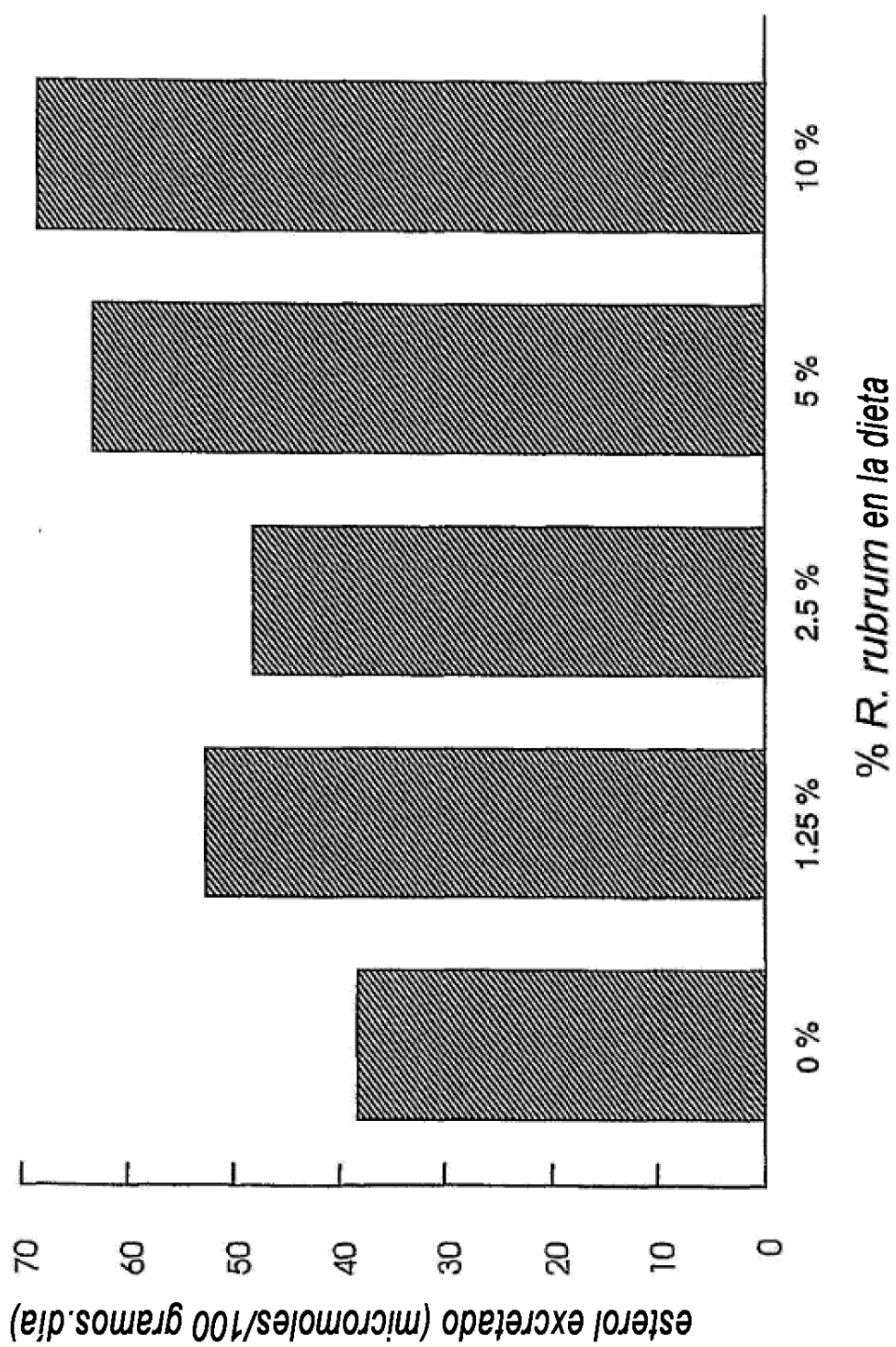


Fig. 11



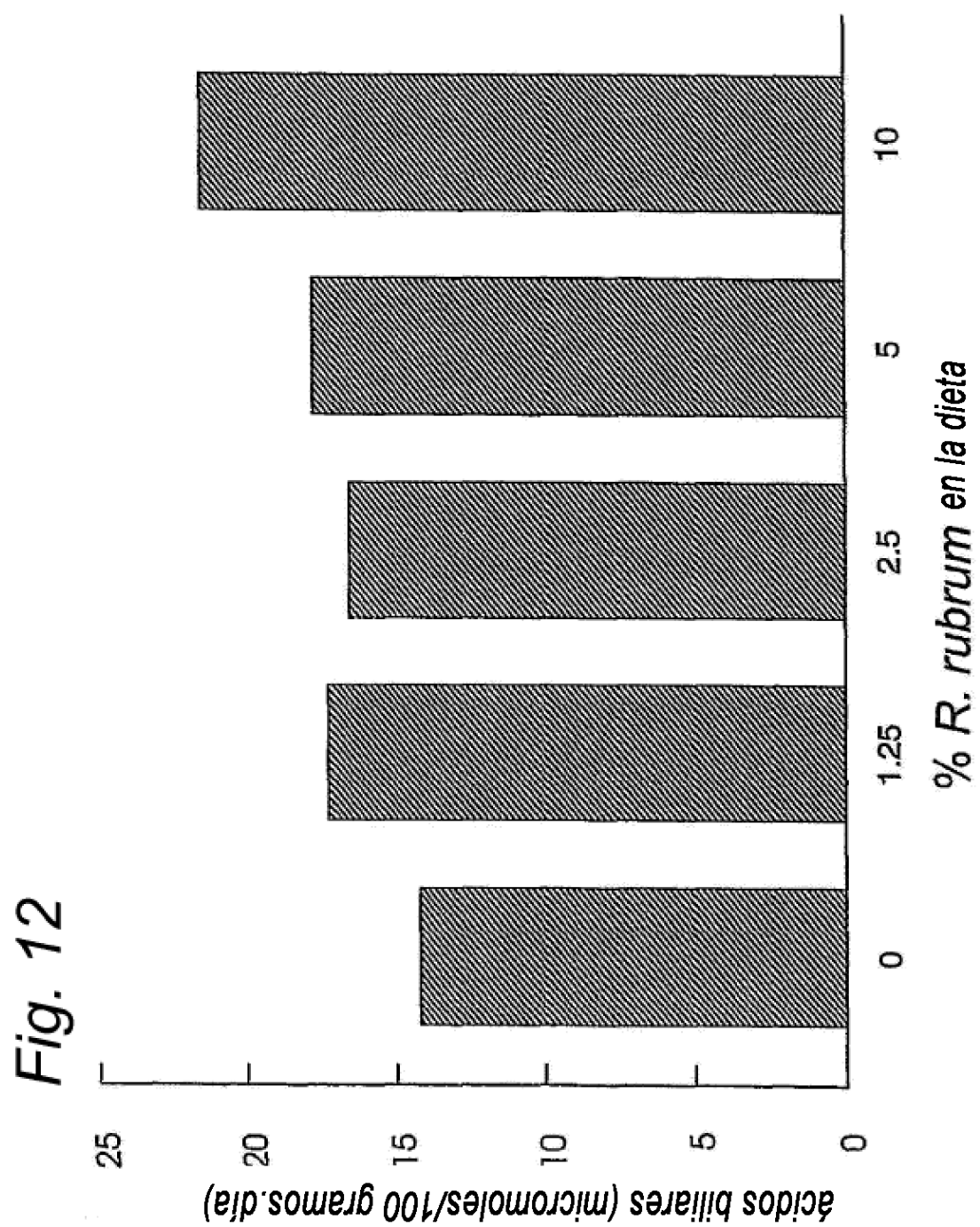


Fig. 13

