



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 031**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03770160 .4**
96 Fecha de presentación : **03.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1562629**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Usos terapéuticos de β -caseína A² y complemento alimenticio que contiene β -caseína A².**

30 Prioridad: **04.10.2002 NZ 521955**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2009

73 Titular/es: **A2 Corporation Limited**
Level 5, 235 Broadway
Newmarket, Auckland, NZ

72 Inventor/es: **Campbell, Julie Hazel;**
Tailford, Kristy Ann;
McLachlan, Ulrike Hf y
McLachlan, Corran Norman Stuart

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 329 031 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

Usos terapéuticos de β -caseína A² y complemento alimenticio que contiene β -caseína A².

5 **Campo técnico**

Esta invención se relaciona con el uso de β -caseína A² para la reducción de ciertos riesgos de enfermedad, tales como niveles de colesterol, lípido, y triglicérido, y proporciones LDL:HDL. En particular, la invención se relaciona con la prevención o tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con niveles elevados de tales factores de riesgo. La invención se relaciona adicionalmente con un complemento alimenticio que contiene β -caseína A².

Antecedente

La enfermedad cardiovascular es generalizada y prevalece en el mundo occidental de hoy. La búsqueda para la prevención y tratamiento de esta enfermedad, y para los factores de riesgo asociados con esta, es un desafío permanente.

La hipercolesterolemia está implicada como un factor de alto riesgo para enfermedades cardiovasculares que incluyen arteriosclerosis, aterosclerosis y xantomatosis. La hipercolesterolemia es influenciada por la dieta, la herencia, ambiente, estilo de vida, otras enfermedades y estrés, que llevan a infartos del miocardio y apoplejías a una edad temprana.

La hipercolesterolemia es una afección con niveles elevados de colesterol total de circulación, colesterol-LDL (lipoproteína de baja densidad) y colesterol-VLDL (lipoproteína de muy baja densidad). En particular, los niveles altos de LDL y VLDL se asocian positivamente con arteriosclerosis coronaria mientras que niveles altos de HDL son factores de riesgo negativo. El papel de la oxidación de LDL ha ganado mucha atención en la literatura. Está bien documentado que el LDL modificado, o más específicamente el LDL oxidado, tiene una capacidad incrementada para unir paredes celulares de músculo liso y endoteliales promoviendo así lesión adicional por oxidación continuada dentro del lumen de las arterias.

Adicionalmente, el LDL oxidado se conoce por invocar un rango de respuestas fisiológicas involucradas directamente en el proceso aterosclerótico. Estas respuestas incluyen la estimulación de la secreción de mediadores de respuesta inflamatoria (por ejemplo interleuquina-1, interleuquina-6, factor alfa de necrosis de tumor y factor de estimulación de colonia macrófaga) que son quimioatrayentes para macrófagos que reconocen el LDL oxidado dentro del espacio subendotelial y engullirlos activamente, posteriormente se convertirán en células espumosas. Las células espumosas luego se agregan para formar estrías de grasa. Tales estrías de grasa son la primera lesión característica identificable de aterosclerosis avanzada.

La hiperlipidemia también predispone a enfermedad coronaria, así como también a cáncer y obesidad. La hiperlipidemia es uno de los factores de alto riesgo útiles en el diagnóstico temprano de estas enfermedades potencialmente mortales.

La hiperlipidemia es una afección en donde se elevan los parámetros de lípido en la sangre. Las fracciones de lípidos en la sangre circulante son colesterol total, LDL, VLDL, y triglicéridos. Los niveles seguros de estos de acuerdo con las directrices de la Asociación de Corazón Americana se representan adelante. El tratamiento activo mediante modificaciones de dieta y fármacos son necesarios para reducir el riesgo de fatalidad cuando los niveles son anormales.

colesterol total (TC)	>240 mg/dL
Colesterol-LDL	>160 mg/dL-Apo(B) Factor aterógeno
Colesterol-HDL	<35 mg/ dL Lp(a) Factor aterógeno
Triglicéridos	>150 mg/dL

Como con la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia resulta de dieta, herencia, estilo de vida, ambiente, enfermedades familiares, o estrés. La afección puede ser heredada o secundaria a otro trastorno, tal como lupus sistémico eritematoso (SLE), hipotiroidismo, síndrome nefrótico, síndrome de Cushing, diabetes melitus, obesidad, alcoholismo, terapia corticosteroide o terapia con estrógenos.

La hipercolesterolemia e hiperlipidemia son también la principal causa de la aterosclerosis. La aterosclerosis es responsable de muchas muertes en los Estados Unidos que cualquier otra afección única. La enfermedad cardiaca aterosclerótica que involucra las arterias coronarias es la causa simple más común de muerte, que representa un tercio de todas las muertes. La interferencia aterosclerótica con el suministro sanguíneo al cerebro (que causa apoplejía) es la tercera causa más común de muerte (después del cáncer). La aterosclerosis también origina una gran cantidad de enfermedades serias al reducir el flujo sanguíneo en otras arterias principales, tal como aquellas de los riñones, las piernas y los intestinos.

Aterosclerosis es una afección cardiovascular que ocurre como un resultado de estrechamiento, o estenosis, de las paredes arteriales. El estrechamiento es debido a la formación de placas (parches levantados) o estrías en el revestimiento interior de las arterias. Estas placas consisten de LDL oxidizada, monocitos, macrófagos, células espumosas, células musculares dañadas, tejido fibroso, grupos de plaquetas sanguíneas, colesterol, y algunas veces calcio. Estas tienden a formarse en regiones de flujo sanguíneo turbulento y se encuentran más a menudo en gente con altas concentraciones de colesterol en la corriente sanguínea. El número y espesor de las placas incrementa con la edad, originando pérdida del revestimiento liso de los vasos sanguíneos y fomentar la formación de trombos (coágulos sanguíneos). No es común para los fragmentos de trombos romper y formar émbolos, que viajan a través del torrente sanguíneo y bloquear los vasos más pequeños (por ejemplo arterias coronarias) que llevan a daño isquémico de los tejidos, o cardiopatía isquémica.

La medicación no es un tratamiento satisfactorio para la cardiopatía isquémica porque ya se han hecho gran parte de los daños a las paredes arteriales. Los fármacos anticoagulantes se han utilizado para tratar de minimizar la coagulación secundaria y la formación de embolo, pero estas tienen poco o ningún efecto sobre el progreso de la enfermedad. Los fármacos vasodilatadores se utilizan para proporcionar alivio de los síntomas, pero no tienen ningún valor curativo.

El tratamiento quirúrgico está disponible para algunas situaciones de alto riesgo. La angioplastia con balón puede abrir los vasos estrechos y promover un suministro de sangre sin sondas. El suministro de sangre al músculo del corazón, luego del bloqueo de vasos coronarios o daño, también se puede restaurar a través de un bypass de injerto de vena. Los ateromas grandes y las obstrucciones arteriales calcificadas se pueden remover endarterectomía, y los segmentos completos de los vasos periféricos enfermos se pueden reemplazar ser sustituida por injertos de tejido de tubo de plástico.

En algunos casos la reducción de hipercolesterolemia se puede lograr mediante modificación de la dieta y/o uso de fármacos minimizando por lo tanto el riesgo de fatalidad de la enfermedad. La reducción del colesterol en el suero en humanos se ha alcanzado mediante el consumo de fibra de planta vegetal y otros componentes efectivos de los alimentos. Sin embargo, subsiste una necesidad de un tratamiento seguro y efectivo para las afecciones anteriores.

En adición a los otros factores de riesgo anotados anteriormente, existe ahora evidencia considerada ligada al consumo de leche, particularmente la leche de vacas *Bos taurus* (vacas domésticas), con enfermedades tal como diabetes, aterosclerosis y enfermedad coronaria. El efecto sobre la hipercolesterolemia se muestra en la JP 6165655 A que describe el uso de suero de caseína y otras proteínas de suero.

La composición de la caseína de leche obtenida de ganado vacuno alrededor del mundo se ha investigado por lo tanto en detalle, con particular referencia a vínculos causales entre diferentes caseínas y enfermedades tal como diabetes y enfermedad coronaria. Se ha enfocado la atención sobre la β -caseína, encontrada en leche de bovinos.

Se conocen ocho variantes de la proteína β -caseína. Estas se identifican como β -caseínas A¹, A², A³, B, C, D, E y F. Las variantes prevalentes en la leche de las poblaciones bovinas del mundo con β -caseína A¹ y β -caseína A². La distinción entre ellas en el nivel de estructura primaria, o secuencia de aminoácido, es que la β -caseína A¹ tiene el aminoácido histidina en la posición 67 mientras que la β -caseína A² tiene el aminoácido prolina en la posición 67. Las otras variantes de β -caseína, aunque ellas pueden diferir en otras posiciones de aminoácido, también se pueden distinguir sobre la base de si los residuos de histidina o prolina en la posición 67. Así, las β -caseínas B, C y F tienen la histidina en la posición 67 y la β -caseína A³, D y E tiene la prolina en la posición 67.

La evidencia epidemiológica sugiere fuertemente que la β -caseína A¹ alimenticia es perjudicial a la salud humana. Por ejemplo, la WO 96/14577 describe el impacto de la β -caseína A¹ sobre la diabetes Tipo I. La evidencia epidemiológica sugiere que la β -caseína A¹ estimula la actividad diabetogénica en humanos. Adicionalmente, la WO 96/14577 describe la inducción de diabetes autoinmune, o Tipo I, en el modelo de ratón (NOD) diabético no obeso por vía del consumo de β -caseína A¹. La invención descrita se enfoca en la reducción del riesgo de contraer diabetes Tipo I en un individuo susceptible al restringir la leche o absorción de producto lácteo de aquel individuo por leche que contiene solo variantes de β -caseína no diabetogénicas.

La WO 96/36239 aboga por la prevención de β -caseína A¹ en la dieta humana. La evidencia epidemiológica establece una correlación entre el consumo de β -caseína A¹ en varias poblaciones y la incidencia de la enfermedad coronaria. La invención descrita en ese documento se enfoca en la prevención de β -caseína A¹ al seleccionar vacas lecheras mediante prueba del material genético para el ADN que codifica las varias β -caseínas.

Así, se ha documentado bien el vínculo entre la β -caseína A¹ y la diabetes y el vínculo entre la β -caseína A¹ y la enfermedad coronaria. Adicionalmente, se ha mostrado recientemente que los efectos nocivos de la β -caseína A¹ ahora se extienden a trastornos neurológicos. La WO 02/19832 describe la prevención de inducir o agravar un trastorno neurológico o mental al proporcionar leche que no contiene ninguna "variante de histidina". Una variante de histidina se define en tal documento como una variante de β -caseína que tiene histidina en la posición 67. La β -caseína A¹ es tal una variante de histidina.

La literatura actual se enfoca en el hallazgo de que la β -caseína A¹ es perjudicial para la salud, y por lo tanto que se debe eliminar la β -caseína A¹ de la dieta de poblaciones humanas. La mayoría de los rebaños de vacas producen leche que contiene predominantemente β -caseína A¹ y β -caseína A², y poca (si existe) de las otras variantes de β -caseína.

El deseo de eliminar la β -caseína A¹ de la absorción alimenticia de una población se puede lograr por lo tanto al proporcionar leche para consumo humano que contiene solo β -caseína A² de las posibles variantes de β -caseína. En otras palabras, se ha motivado el manejo de la leche (y alimentos procesados a partir de tal leche) para contener solo β -caseína A² mediante la prevención de β -caseína A¹ y la minimización consecuente de riesgos asociados con diabetes, enfermedad coronaria, y trastornos neurológicos.

La WO 01/00047 describe un complemento alimenticio que comprende un producto lácteo que contiene predominantemente la variante A² de la β -caseínas, y que se fortifica con un compuesto (o compuestos) que reduce los niveles de homocisteína de plasma humano. Tales compuestos pueden incluir betaína, cobalamina, ácido fólico o piridoxina. Se describen dos posibles ventajas de estos. Primero, el reemplazo de β -caseína A¹ en el complemento con β -caseína A² reducirá el riesgo de diabetes. Segundo, es deseable reducir los niveles de homocisteína, debido a que estos se correlacionan altamente con la enfermedad coronaria, y la homocisteína es también un factor de riesgo reconocido para la aterosclerosis. Así, existe un método combinado, utilizando la estrategia de la homocisteína junto con la estrategia de la diabetes, para controlar enfermedad vascular.

La WO 01/00047 describe adicionalmente que la β -casomorfina-9, el producto de digestión putativa de la β -caseína A², puede proporcionar inmunidad contra la diabetes. Los resultados experimentales muestran que ratas alimentadas con β -caseína A² tienen una menor incidencia de diabetes que los animales de control. La β -casomorfina-9 se describe como un modulador de función inmune, y por lo tanto un posible atenuador del proceso de enfermedad de diabetes.

Sin embargo, se debe notar que los datos que pertenecen a la modulación inmune mediante β -casomorfina-9 se basan en experimentos que utilizan antígenos inyectados, en lugar de acceder al intestino, en el modelo de ratón NOD de diabetes. Adicionalmente, todavía no se establece que la β -casomorfina-9 es el único compuesto activo producido por la digestión de β -caseína A². Así, es difícil extrapolar los datos basados β -casomorfina-9 y se predice exactamente si la β -caseína A² tendrá la misma actividad biológica.

Se nota en la WO 01/00047 que existe una conexión causal entre la diabetes y enfermedad coronaria. Sin embargo, la sugerencia de que las propiedades que atenúan la diabetes de la β -casomorfina-9 significa que la β -caseína A² puede, por lo menos indirectamente, tener un efecto protector contra la enfermedad coronaria basado en una relación totalmente tenue y se considera una sugerencia sorprendente dado los experimentos realizados.

Los inventores ahora han encontrado sorprendentemente, por primera vez, que el consumo de β -caseína A² reduce los niveles de colesterol en el suero, reduce niveles de triglicéridos circulantes, reduce concentraciones de LDL y así proporcionan LDL:HDL, reduce niveles de suero de apolipoproteína B y es ateroprotectora.

Es por lo tanto un objeto de la invención proporcionar un uso médico para prevenir o tratar varias enfermedades asociadas con niveles de colesterol en el suero de mamíferos, niveles de colesterol LDL o niveles de triglicéridos mediante la ingestión de una composición que contiene β -caseína A² en cantidades suficientes para tener un efecto preventivo o terapéutico contra tales enfermedades, o para por lo menos proporcionar una alternativa útil.

Declaraciones de la invención

De acuerdo con la invención se proporciona una β -caseína para uso en el tratamiento de hipercolesterolemia, hiperlipidemia y aterosclerosis al reducir el nivel de suero en un mamífero de uno cualquiera o más de los siguientes:

- a) colesterol;
- b) colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) relativo a colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL);
- c) colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL);
- d) colesterol de lipoproteína de muy baja densidad (LDL);
- e) apolipoproteína B; y
- f) triglicéridos

en donde la β -caseína está comprendida de por lo menos 95% de β -caseína A². Preferiblemente, la β -caseína está comprendida solamente de β -caseína A².

Se prefiere que la composición es un alimento o producto alimenticio, tal como leche o un producto que contiene leche o procesado de leche.

En una realización preferida de la invención, la composición es un complemento alimenticio, preferiblemente un nutracéutico que se ingiere para optimizar uno cualquiera o más del grupo que consiste de desempeño durante el ejercicio, pérdida de peso, ganancia de peso, construcción muscular, y reparación muscular.

ES 2 329 031 T3

Se prefiere adicionalmente que la composición se haya formado por la adición de una cantidad de β -caseína A² suficiente para alterar los niveles de colesterol en el suero y/o niveles de triglicérido en el suero es un humano.

5 Preferiblemente la β -caseína A² se obtiene de la leche de ganado bovino o de la leche de yaks, búfalo, oveja o cabras

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 muestra la relación íntima a media promedio (indicador del engrosamiento de arteria) de la aorta, para la β -caseína A², β -caseína A¹ y de conejos blancos NZ alimentados con suero.

15 La Figura 2 muestra el grado de engrosamiento neoíntimo de la arteria carótida derecha desendotelializada (indicadora de progreso de enfermedad arterial luego de daño a las paredes arteriales). A: Ejemplo del Grupo 1 que no muestra engrosamiento neoíntimo, B: Ejemplo del Grupo 2 que muestra alguna formación de lesión en la capa íntima, y C: Ejemplo del Grupo 5 que muestra engrosamiento íntimo severo.

La Figura 3 muestra niveles de colesterol en el suero para conejos blancos NZ alimentados con β -caseína A²-, alimentados con β -caseína A¹- y alimentados con suero.

20 La Figura 4 muestra proporciones LDL a HDL en suero para conejos blancos NZ alimentados con β -caseína A², alimentados con β -caseína A¹ y alimentados con suero.

Descripción detallada

25 Como se utiliza aquí el término “LDL” significa lipoproteína de baja densidad, “HDL” significa lipoproteína de alta densidad, y “VLDL” significa lipoproteína de muy baja densidad.

Como se utiliza aquí el término “triglicérido” significa un lípido o grasa neutral que consiste de glicerol combinado con tres moléculas de ácido graso.

30 Como se utiliza aquí el término “enfermedad cardiovascular” es cualquier enfermedad de los vasos sanguíneos del sistema circulatorio originada por, facilitada por o mostrada por estar ligada a altas concentraciones anormales de lípidos en los vasos.

35 Como se utiliza aquí el término “arteriosclerosis” es una degeneración de las paredes de las arterias debido a la formación de células espumosas y estrías aórticas que estrechan las arterias. Esto limita la circulación sanguínea y predispone a un individuo a trombosis.

40 Como se utiliza aquí el término “aterosclerosis” es una enfermedad de las arterias en las que las placas grasas se desarrollan en las paredes internas, con eventual obstrucción del flujo sanguíneo.

45 Como se utiliza aquí el término “apolipoproteína B” o “apoproteína B” o “Apo B” se refiere al componente de proteína del colesterol LDL que transporta proteínas. El colesterol sintetizado de novo se transporta del hígado e intestino a los tejidos periféricos en la forma de lipoproteínas. La mayor parte de la apolipoproteína B se secreta en el sistema circulatorio como VLDL.

50 Como se utiliza aquí el término “hipercolesterolemia” significa niveles elevados de colesterol total circulantes, colesterol LDL y colesterol VLDL según las directrices del Informe del Panel de Expertos del Programa Educativo Nacional sobre Colesterol (NCEP) de Detección, Evaluación de Tratamiento de Colesterol Alto en Adultos (Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39).

55 Como se utiliza aquí el término “hiperlipidemia” o “hiperlipemia” es una afección en donde se elevan los parámetros de lípido en la sangre. Esta afección manifiesta una concentración anormalmente alta de grasas. Las fracciones de lípidos en la sangre circulante son, colesterol total, LDLs, VLDLs, y triglicéridos.

60 Como se utiliza aquí el término “lipoproteína”, tal como en VLDL, LDL y HDL, se refiere a un grupo de proteínas encontradas en el suero, plasma y ganglios que son importantes para el transporte de lípidos. La composición química de cada lipoproteína difiere en que el HDL tiene una mayor proporción de proteína *versus* lípido, mientras que el VLDL tiene una menor proporción de proteína *versus* lípido.

Como se utiliza aquí el término “xantomatosis” es una enfermedad evidenciada por un edema amarillento o placas en la piel que resultan de depósitos de grasa. La presencia de xantomas se acompaña usualmente por niveles de colesterol elevado.

65 Como se utiliza aquí el término “GRAS” significa “generalmente considerado como seguro” con respecto a aditivos alimenticios.

ES 2 329 031 T3

Los inventores han mostrado por primera vez el resultado sorprendente e interesante de que el consumo de β -caseína A² tiene efectos benéficos positivos, que incluyen:

1. La disminución de niveles de colesterol en el suero,
2. La reducción de niveles de triglicéridos circulantes, y
3. La reducción de concentraciones de LDL y proporciones LDL:HDL.

Estos efectos observados por los inventores significan que el consumo de β -caseína A² es benéfico para la prevención o tratamiento de una variedad de enfermedades o trastornos que incluyen:

1. hipercolesterolemia,
2. hiperlipidemia, y
3. aterosclerosis.

Este importante hallazgo altera el pensamiento actual de que la β -caseína A² es simplemente benéfica porque la β -caseína, A¹ contribuye a ciertas enfermedades, tal como diabetes y enfermedad coronaria. El hallazgo de los inventores es que la β -caseína, A² tiene un efecto benéfico por derecho propio.

El hallazgo se soporta por estudios experimentales en donde diez grupos de conejos blancos NZ se alimentan *ad libitum* con dietas controladas. Luego del sacrificio de los animales, se miden los niveles de colesterol en el suero, proporciones LDL:HDL y niveles de triglicéridos.

En los Grupos de conejos 3-8, se prueban tres concentraciones de β -caseína A¹ y A² (5%, 10% y 20%) en la dieta, con proteína de suero agrega de tal manera que un total de 20% de proteína de leche está presente en cada dieta (es decir 15%, 10%, 0% de proteína de suero agregada respectivamente). También se agrega colesterol (0.5%) a esas dietas para asegurar lesiones medibles. Como controles, se alimentan conejos del Grupo 1 con 20% proteína de suero y se alimentan los conejos del Grupo 2 con 20% proteína de suero más 0.5% de colesterol. Los grupos 9 y 10 se alimentan con 10% de β -caseína A¹ (o A²) más 10% de solo suero. Los conejos en la dieta especialmente preparada solo comen un promedio de 30.05 \pm 0.97 gramos por día.

No es sorprendente que casi todos los conejos pierdan peso durante el periodo experimental de 6 semanas, con un 5.62% de promedio de pérdida de peso. Esto no afecta su salud general y los conejos están alertas, sensibles y no muestran signos de sufrimiento. Esto es consistente con estudios tempranos que encuentran que, con conejos alimentados con una dieta semisintética que contiene caseína, se reduce la absorción del alimento y la ganancia de peso a la mitad cuando la dieta no se acepta rápidamente, aunque los conejos todavía parecen saludables. Los conejos colocados en un alto nivel de caseína alimenticia (50%) fallan en ganar peso durante el curso de tal estudio.

10% de β -caseína A² con colesterol no agregado (Grupo 10) produce un nivel de colesterol de suero significativamente más bajo en t = 6 semanas que todos los otros Grupos que incluyen solo suero (Grupo 1) y 10% de β -caseína A¹ (Grupo 9). El Grupo de β -caseína A¹ tiene niveles de colesterol en el suero mayores que el Grupo con solo suero. Esto resalta la necesidad de examinar el efecto de las β -caseínas específicas diferentes de mezclas, y es la primera vez que los efectos diferenciales de las variantes de β -caseína en los niveles de colesterol en el suero se han descrito.

El nivel de colesterol en el suero medio en conejos alimentados solo con 20% de β -caseína A¹ (Grupo 9) es más alto que aquellos en el Grupo 1 (solo suero) de animales. Así, la β -caseína A¹ puede ser levemente más aterogénica que la proteína de suero. La adición de 0.5% de colesterol a todas dietas incrementa los niveles de colesterol en el suero por lo menos 3 veces, que es mucho más que el efecto de la β -caseína A¹ comparado con solo suero. No existe diferencia significativa entre los niveles de colesterol en el suero de conejos alimentados con β -caseína A¹ o A² en la presencia de colesterol alimentario.

El nivel de LDL en el suero en el Grupo 10 (β -caseína A²) es significativamente más bajo que aquel en los Grupos 9 (β -caseína A¹) o 1 (solo suero), todos con colesterol no alimentario. El nivel de LDL para el Grupo 9 es mayor que aquel para el Grupo 1, pero no significativamente. En la presencia de colesterol alimentario, el LDL en el suero se eleva significativamente en todos los Grupos (2-8) y estos no son significativamente diferentes de cada uno. Un patrón similar ocurre para el HDL en el suero excepto que el Grupo 10 no es significativamente menor que el Grupo 1.

El potencial antiaterogénico de la β -caseína A² se destaca adicionalmente por las proporciones de LDL a HDL. Existe una diferencia más grande en los niveles LDL en el suero entre los Grupos 9 (β -caseína A¹) y 10 (β -caseína A²) que en los niveles de HDL en el suero. Así las proporciones LDL a HDL son significativamente menores para los animales alimentados con β -caseína A² que para los animales alimentados con β -caseína A¹. En efecto, la proporción LDL a HDL del Grupo 10 es significativamente más baja que todos los otros Grupos, que incluyen el Grupo 1 (20% de solo suero). No existe diferencia significativa entre todos los Grupos para triglicéridos o homocisteína.

ES 2 329 031 T3

Así, la β -caseína alimenticia A², en la ausencia de una dieta enriquecida en colesterol, lleva a niveles más bajos de colesterol en el suero (total, LDL y HDL) que la β -caseína A¹ y el suero.

Se ha encontrado que la β -caseína A¹ y A² lleva a estrías de grasa comparadas con 20% de suero, pero la β -caseína A² produce menos lesiones extensas que la β -caseína A¹. En efecto, 10% de la β -caseína A¹ sin el colesterol alimentario produce aproximadamente la misma cantidad de lesiones como 10% de β -caseína A² con colesterol alimentario. El grosor de las estrías de grasa en el arco aórtico de conejos alimentados con β -caseína A², con o sin colesterol alimentario, es cero u otro muy cercano a cero. En contraste, el grosor de las estrías del arco aórtico de grasa en conejos alimentados con β -caseína A¹ es significativamente mayor. Así, la β -caseína A¹ es más aterogénica que el suero y la variante de caseína A².

En la presencia de 0.5% de colesterol alimentario, solo el 20% de β -caseína A² produce un área de superficie más pequeña de la aorta cubierta por estrías de grasa que el 20% de suero. Sin embargo, el grosor de las estrías de grasa en el arco aórtico es significativamente más pequeño para 20% y 5% de animales alimentados con β -caseína A² comparado con el suero (0.03 ± 0.015), con un valor menor (pero no significativo) para 10% de animales alimentados con β -caseína A² (0.01 ± 0.008).

Se conoce la lesión de globo de las arterias combinada con una dieta enriquecida en colesterol por producir lesiones en conejos que se semejan cercanamente al ateroma humana avanzada.

No existe diferencia significativa en la proporción íntima a media de la arteria carótida derecha lesionada por balón de conejos alimentados con β -caseína A¹ o A² con o sin colesterol alimentario. Sin embargo, grupos alimentados con β -caseína A² (ambos con y sin colesterol agregado) tienen engrosamiento neoíntimos más pequeño que sus contrapartes alimentadas con β -caseína A¹. Los animales alimentados con β -caseína A² generalmente tienen íntimas ligeramente más delgadas que aquellos alimentados con suero (con y sin colesterol alimentario).

Estos resultados, combinados con el hecho de que el 10% de A² sin colesterol agregado producen un nivel de colesterol de suero significativamente más bajo que todos los otros grupos que incluyen solo suero y 10% de β -caseína A¹, demuestran por primera vez que la β -caseína A² tiene un efecto ateroprotector mientras que la β -caseína A¹ es aterogénica.

Estos resultados son consistentes con los estudios epidemiológicos, que sugieren una fuerte relación entre la mortalidad de enfermedad cardiovascular y consumo de β -caseína A¹.

La composición de la invención puede estar en la forma de β -caseína A² mezclada con una o más sustancias, y puede estar en la forma de una solución acuosa o suspensión o emulsión, o puede ser un sólido tal como una forma granular o forma en polvo. Ciertas composiciones de la invención pueden estar en su forma de ocurrencia natural, especialmente leche o productos derivados o procesados de tal leche. Otras composiciones de la invención pueden ser sustancias complementadas por la adición de β -caseína A², tal β -caseína A² se ha purificado de, u obtenido como una fracción de la leche o un producto procesado de tal leche, o tal β -caseína A² está presente en la leche o un producto procesado de tal leche.

Será claro para aquellos expertos en la técnica que la composición o producto alimenticio de la invención puede incluir, pero no se limita a, leche o productos lácteos, complementos nutricionales, por ejemplo formulaciones de ganancia de peso, aditivos alimenticios, helado u otras conservas basadas en lácteos congelados, productos lácteos fermentados tal como yogurt o cuajada, quesos que incluyen quesos procesados de grasa total, desgrasado parcial y libres de grasa, suero de leche, producto alimenticios enriquecidos a través de la adición de productos lácteos tal como líquidos, leche de la cual sean removidos las moléculas alergénicas, conservas tales como chocolate, productos lácteos carbonados, que incluyen aquellos con fosfato y/o citrato agregado, formulaciones para lactantes que pueden contener leche entera, parcialmente desgrasada o sin grasa, mezclas de bebidas en polvo o líquidas, suero de mantequilla, y polvo de suero de mantequilla.

El modo preferido de administración de la composición de la invención es mediante la ingestión oral. Sin embargo, se puede administrar apropiadamente la composición por otros medios, tal como intravenosamente. La composición de la invención se puede ingerir, o de otra forma administrar, en cualesquier niveles de dosificación y frecuencias de dosificación adecuadas para controlar niveles de colesterol, LDL y triglicéridos. Típicamente, una cantidad de la composición se ingerirá diariamente o semanalmente por un humano.

Será también claro para los practicantes expertos que la cantidad de β -caseína A² a ser ingerida o de otra forma administrada variará entre los sujetos.

La invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se apreciará que la invención no se limita a estos ejemplos.

65

Ejemplos

Materiales y Métodos

5 Se obtienen sesenta conejos cruzados Nueva Zelanda blancos/Lop de ambos sexos (16-24 semanas de edad) de la Universidad de Queensland Central Animal Breeding House.

Resumen del Protocolo

10 En el tiempo = 0, la arteria carótida derecha de todos los conejos se desendotelializan en globo. Los conejos luego se dividen en 10 Grupos y se alimentan con las dietas específicas durante 6 semanas. Se toman muestras de sangre en t=0, 3 y 6 semanas para análisis de constituyente de suero. En t=6 semanas, todos los animales se sacrifican y se toman muestras de tejido. Un resumen del protocolo de estudio se muestra en la Tabla 1.

15
20
25
30
35
TABLA 1
Resumen de Protocolo

semana	0	1	2	3	4	5	6
Cirugía	X						
Dieta	XXXXX XX	XXXXX XX	XXXXX XX	XXXXX XX	XXXXX XX	XXXXX XX	XXXXX XX
sangrados	X			X			x
Pesos	X	X	X	X	X	X	X
Sacrificio							X
Cirugía en t=0; gránulos de estudio distribuidos diariamente; recolección de sangre en t=0, 3, 6 semanas; se registran pesos semanalmente; sacrificio en t=6 semanas							

Cirugía

40 En el tiempo = 0, todos los 60 conejos se anestesian con una mezcla de cetamina (30 mg/kg) y xilazina (7 mg/kg) i.m. y se mantiene en Halothano (Laser Animal Health, Qld, Australia). Se hace una incisión a través de la piel y fascia, y se hace disección hemostática e incisión a través del músculo estilohioide exponiendo la parte superior de la arteria carótida común derecha. La arteria carótida común no lesionada, izquierda sirve como un control contralateral. Se ligan temporalmente las ramificaciones con sea 5/0 (Davis & Geck, Danbury, CT, USA) y se introduce un catéter de embolectomía 2 French (2F) Fogarty (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA) a través de la arteriotomía hecha en la arteria tiroide superior, una ramificación de la arteria carótida externa (La Figura 2.2). Se hace avanzar el catéter 10 cm (al arco aórtico), el globo se infla con 0.2 ml de solución de salida y se retira el catéter con el fin de desendotelializar la arteria.

50 Se desarrolla el procedimiento de lesión tres veces en cada animal para asegurar la remoción completa del endotelio. Después del daño, se remueve el catéter, la arteria tiroide superior se liga con seda 5/0 y se cierra la herida utilizando suturas ramificadas de Dexon 2/0 (Sherwood Medical, St. Louis, MO, USA). Se administra un antibiótico de amplio espectro subcutáneamente (5 mg/kg Baytril, Bayer Australia Ltd, Pymble, Australia) que contiene 50 mg/ml de enrofloxacin en la terminación del procedimiento. Los conejos se monitorean postoperativamente y se regresan a sus jaulas cuando están completamente consientes. Durante tres días postcirugía cada animal se alimenta forzosamente con aproximadamente 170 mg de paracetamol (SmithKline Beecham International, Ermington, Australia) y se continúa la administración subcutánea de antibióticos.

Dietas para Conejo

60 El estudio involucra 10 dietas, las composiciones de las cuales se muestran en la Tabla 2. Esencialmente, cada dieta contiene 20% de proteína de leche total, pero difiere en la proporción de proteína de caseína a proteína de suero. Las dietas de los Grupos 1, 9 y 10 no contienen aditivos adicionales, mientras que las dietas de los Grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se complementan con 0.5% de colesterol. Hay 6 conejos en cada grupo y se continúa la dieta durante 6 semanas.

ES 2 329 031 T3

TABLA 2

Composiciones de dietas de estudio ofrecidas a conejos durante 6 semanas. Dieta

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ingredientes (gramos/kg)										
β -caseína A ¹	0	0	50	100	200	0	0	0	100	0
β -caseína A ²	0	0	0	0	0	50	100	200	0	100
proteína de suero	228	228	171	113.8	0	171	113.8	0	113.8	113.8
Colesterol	0	5	5	5	5	5	5	5	0	0
DL-Metionina	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Sacarosa	426.3 72	421.3 72	428. 53	435.8 86	449.8 65	428.4 96	435.8 18	449.8 65	440.8 86	440.8 86
Aceite de Maíz	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Aceite de coco	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130
Fibra de Celulosa	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Mezcla de sal#200951	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Mezcla de Vitamina#32 0005	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Bitartrato de colina	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Premezcla de Zinc (5 mg/g)	0.628	0.628	0.47	0.314	0.135	0.504	0.382	0.135	0.314	0.314
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

50

55

60

65

Se ha encontrado que toma varios días para los conejos llegar a acostumbrarse a sus nuevas dietas, que difieren de sus gránulos normales en color, olor, textura y peso. Los alimentos en gránulos en las nuevas dietas son blancos, mientras que los gránulos normales son marrones. Así, durante cinco días antes de cirugía, todos los conejos se destetan en sus respectivas dietas al mezclar cantidades incrementadas de los nuevos gránulos (25%, 50%, 75%, 100%) con gránulos para conejo normal (para un total de 200 gramos). En t=0, solo pocos gránulos (200 gramos por día) se ofrecen (excepciones, ver adelante) para las siguientes 6 semanas y el agua está disponible *ad libitum*. Se conoce que los conejos comen 90-130 gramos de gránulos por día. Sin embargo, 200 gramos se requieren para llenar la tolva de tal manera que los animales puedan alcanzar el alimento. Se proporcionan diariamente 200 gramos de gránulos frescos y se determina por ponderación la cantidad de gránulos que quedan sin comer por cada conejo cada día.

Se emplean varias medidas para animar a los conejos a comer la nueva dieta. Primero, se deja caer una pequeña cantidad de aceite de anís en la parte posterior de la tolva de alimentación para estimular el apetito de los conejos. Segundo, si un conejo todavía no come su nueva dieta o su pérdida de peso alcanza 10% del peso corporal original, se agrega alimento normal a la dieta en 25, 50 o 75% de mezclas. Cuando esto ocurre, los gránulos de dieta blancos se separan cuidadosamente de los gránulos normales marrón y se pesan cada día para determinar la cantidad total de dieta de experimento consumida. Finalmente, si la pérdida de peso continúa, se ofrece a los conejos 200 gramos de comida normal por día hasta que su peso incrementa.

ES 2 329 031 T3

Peso de Conejos

Se pesan semanalmente todos los conejos, comenzando el día de cirugía, hasta la semana de sacrificio.

5

Recolección de Sangre

Se recolecta la sangre de cada conejo antes de cirugía, al comienzo de la dieta y en t=3 y 6 semanas. Cada conejo se envuelve de manera segura y se rasura la piel que cubre la arteria central de la oreja. Se inserta un catéter de calibre 24 (Becton Dickinson Pty Ltd, NSW, Australia) y se recolecta 5 mL de sangre en tubos estériles. Se le permite a la sangre coagular y se centrifuga a 4500 rpm durante 10 minutos. Se extrae el sobrenadante del suero y se analiza para colesterol de suero total, triglicéridos, HDL, LDL y homocisteína.

15 *Sacrificio del Conejo*

seis semanas después de daño, se inyectan 1000 I.U. de heparina (David Bull Laboratories, Mulgrave, Victoria) en 1 ml de solución salina en una vena de la oreja de cada conejo. Cinco minutos después, se les practica eutanasia a los conejos con una sobredosis de pentobarbitona (325 mg/ml Lethobarb, (Virbac Australia Pty Ltd, Victoria)). Se hace una incisión de la barbilla a la pelvis y se continúa a las extremidades traseras y delanteras. Luego se hace incisión cuidadosamente a la cavidad peritoneal para exponer los órganos internos y se corta la caja de costillas para exponer el corazón. Se canúla el ventrículo izquierdo con una aguja de amplio calibre adherida a la tubería que a su vez se conecta a un aparato de perfusión. Una pequeña sección de la vena cava inferior se limpia y se corta. El sistema circulatorio se lava a chorro con 1 litro de Solución Salina Amortiguada con Fosfato Dulbecco (DPBS) antes que la fijación de la perfusión arterial se desarrolle con 1 litro de 4% de formaldehído (Asia Pacific Speciality Chemicals Ltd, NSW, Australia) en DPBS a 100 mm Hg.

30 *Recolección de Tejido*

Se expone y se remueve la aorta completa de la bifurcación iliaca al arco aórtico. Las arterias aórtica comunes derecha (lesionada) y la izquierda (control) se exponen completamente y se remueven. Se limpian todos los vasos de grasa y se adhieren al tejido conjuntivo en tubos con 4% de formaldehído en DPBS.

35

Análisis de Tejido

Teñido En face de Aceite Rojo O para lesiones lumbales

El arco aórtico se remueve por fijación y seccionamiento histológico. El resto de la aorta (aproximadamente 16 cm) se abre longitudinalmente y se corta en cuatro segmentos. Cada segmento se cose (lumen hacia arriba) en pequeñas piezas de plástico claro para asegurar que ellas permanecen planas. Los segmentos se tiñen en face en una solución saturada del tinte lipófilo Aceite Rojo O para facilitar la determinación de área de superficie luminal cubierta por estrías de grasa.

45

Análisis de área de superficie luminal cubierta por estrías de grasa

Se escanean las imágenes de cada segmento aórtico utilizando un Desk Scan II (versión 2.31 a, Hewlett-Packard, U.S.A.) y se mide el área de lesión total utilizando el software de formación de imagen ImageJ (versión 1.23y, National Institute of Health, U.S.A.). Este programa compara la intensidad de las lesiones (teñido con rojo brillante) contra el resto de la superficie arterial (blanco a rosado pálido). Los resultados se expresan como porcentaje del área de superficie cubierta por las lesiones.

55

Arco Aórtico

Tres segmentos de aproximadamente 3-4 mm en longitud se cortan de cada arco aórtico y se colocan en DPBS para dos lavados de 30 minutos cada uno. Los segmentos luego se deshidratan en concentraciones incrementadas de etanol, es decir 70% de etanol durante 30 minutos, luego 95% etanol durante 30 minutos y finalmente, 100% de etanol para tres lavados de 30 minutos cada uno. Ellos luego se colocan en la primera de dos soluciones de resina de infiltración (Technovit 7100, Heraeus, Alemania) y se deja en un rotador durante la noche. Los segmentos luego se transfieren a la segunda solución de resina y se dejan de nuevo en un rotador durante la noche. Cada segmento se coloca luego cuidadosamente derecho en moldes de embebido, se mantiene en el lugar por una cantidad mínima de supercola en la base del molde. La misma mezcla de resina utilizada para la infiltración se mezcla con un endurecedor y este se pipetea en el molde hasta que todos los segmentos se cubren completamente. El plástico se deja polimerizar a temperatura ambiente durante dos horas antes de ser colocado en un horno a 37°C durante la noche. Los bloques plásticos luego se remueven gentilmente de sus moldes y se montan en Histobloque, utilizando Technovit 3040 (Heraeus, Alemania)

ES 2 329 031 T3

como cola. Cada bloque se ajusta de forma segura al microtomo (LKB Bromma, Alemania) y se recorta por el corte aproximadamente 60-70 secciones de 10 Pm cada una. Estas se descargan y el microtomo se establece para cortar secciones de 5 Pm. Se recolectan estas secciones con pinzas y se estira en agua destilada, que se mantiene a temperatura ambiente. Ellos luego se recolectan en un portaobjetos de vidrio y se secan durante aproximadamente 15 minutos a 60°C. Las secciones luego se tiñen durante 10 minutos con Azul Toluidina antes de ser lavados cuatro veces con agua del grifo y se le permite secar al aire.

Arterias carótidas derecha e izquierda

Cuatro y cinco segmentos, cada uno de aproximadamente 3-4 mm de longitud, se cortan de las arterias carótidas izquierda (control) y la derecha (englobada) respectivamente. Se utiliza un número diferente de secciones en el control y los vasos de experimento, para evitar confusión entre tejidos durante la inclusión y el seccionamiento. Los segmentos se deshidratan, embeben, seccionan y tiñen utilizando el método previamente descrito para los segmentos de arco aórtico.

Proporciones íntima a media

Todos los análisis morfométricos de las proporciones íntimas a medias (I:M) de las arterias carótidas englobadas y de control y el arco aórtico se desarrollan utilizando el sistema de Análisis de Imagen Mocha (versión 1.1, Jandel Scientific, Ca., U.S.A.). Las mediciones se toman para determinar el tamaño (en píxeles) de las capas íntima y media en todos los segmentos de cada arteria. Utilizando una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Corporation, N.Y., U.S.A.), la proporción de íntima a media se calcula y registra para cada uno de los tres segmentos de arco aórtico por conejo, los cuatro segmentos de carótidas de control y los cinco segmentos de carótida englobada.

Estadísticas

Se realizan todos los análisis estadísticos utilizando el paquete de software estadístico SigmaStat (Jandel Scientific, Ca., U.S.A.). Los datos de comparación de los análisis morfométricos se llevan a cabo con ANOVA Múltiples de Una Vía, utilizando el Análisis de Varianza "Kruskal-Wallis" en la prueba de Clasificación. Se identifican los valores extremos utilizando la Prueba de Valor extremo de Tukey. En todos los análisis estadísticos un valor P menor de 0.05 se considera significativo. La información se ha presentado gráficamente utilizando Microsoft Excel (Microsoft Corporation, N.Y., U.S.A.). Todos los datos de han reportado como error estándar de la media.

Resultados de dietas para conejo

Se destetan los conejos en sus respectivas nuevas dietas durante unos pocos días antes de $t = 0$, y algunos animales cuya pérdida de peso alcanza 10% tienen si dieta complementada con gránulos normales durante unos pocos días. Así es esencial medir la cantidad de nuevos gránulos comidos por cada animal por día al proporcionar un peso conocido (200 gramos) de gránulos frescos cada mañana y pesar la porción no comida la siguiente mañana inmediatamente antes de ofrecer 200 gramos de gránulos frescos. En donde se ofrece una mezcla de nuevos gránulos (blanco) y gránulos normales (marrón), los dos se separan antes de pesar.

El peso de los gránulos blancos comidos por cada conejo varía entre conejos. Un grupo promedio, el peso de gránulos consumidos solo varía por 12 gramos por día durante el periodo experimental de seis semanas y varía de 23.2 gramos a 35.3 gramos por día (significa 30.48 \pm 0.97 gramos). No existe diferencia significativa en la cantidad de dieta gránulos comidos entre cualquiera de los Grupos. La adición de 0.5% de colesterol a las dietas de lo Grupos 2-8 no influyen la cantidad comida, ni el tipo o cantidad de caseína. Así, mientras que la cantidad de alimento consumido por los conejos es relativamente bajo (significa 30.48 gramos de gránulos blancos por día, significa 10.22 gramos de gránulos por día, significa un total de 40.72 gramos por día) lo que resulta en alguna pérdida de peso, la cantidad de la nueva dieta consumida en cada grupo es relativamente constante y estos resultados entre se pueden comparar.

Peso de Conejo

Casi todos los conejos pierden peso durante las 6 semanas, con solo el Grupo 9 (10% de A¹ sin colesterol agregado) se registra una ganancia de peso promedio de 2.15 \pm 1.2%. El Grupo de conejos 10 (10% A² sin colesterol agregado) solo muestra una pequeña pérdida de peso de -0.92 \pm 0.97%. El Grupo de conejos 1 en 20% de suero solo (sin agregar colesterol) pierde 4.5 \pm 6% de su peso corporal original durante el estudio de 6 semanas, mientras que los restantes Grupos 2-8 (todos con colesterol agregado) pierden 7.57 \pm 4.72% de su peso corporal original.

La mayor pérdida media es por el Grupo 6. Sin embargo esto es enteramente debido a un conejo (K6) que tiene un peso de partida grande de 3.81 kg. Este conejo come un promedio de 21.58 gramos de gránulos por día, aproximadamente 9 gramos por día menos que la media de de todos los conejos (30.50). El K6 no muestra señales de enfermedad y en el tiempo del sacrificio y todos los órganos parecen normales con la excepción de un muy pequeño hígado de

ES 2 329 031 T3

color normal. Los cinco conejos restantes en este Grupo pierden menos de 5% de su peso corporal original. No existe relación evidente entre la proporción o tipo de caseína en el cambio de peso.

5 *Efecto de la Dieta en el Colesterol*

Los niveles de colesterol de la semana 6 de casi todos los Grupos es significativamente diferente del Grupo 1 (20% de suero solo). Interesantemente, el nivel de colesterol en el Grupo 9 (A1) es mayor que en el Grupo 1, pero este no es significativo. También, el nivel de colesterol en el Grupo 8 (20% de A² con colesterol) es aproximadamente la mitad de aquella producida de 20% de suero con colesterol agregado (Grupo 2), aunque esto no es bastante significativo. El Grupo 9 de colesterol de suero es significativamente más bajo que todos los Grupos que tienen colesterol alimentario (Grupos 2-8). El Grupo 10 (A2) de colesterol de suero es significativamente más bajo que en el Grupo 1, y en efecto es significativamente más bajo que en todos los grupos, incluyendo de Grupo 9.

Los resultados indican que la adición a 0.5% de colesterol a la dieta ha originado un incremento en los niveles de colesterol en el suero independientemente de la cantidad del suero en la dieta y las cantidades y tipos de caseína. También, en la ausencia de colesterol alimentario, A² produce bajos niveles de colesterol en el suero que A¹ y el suero.

20 *Efecto de Dieta sobre Triglicéridos*

Los niveles de triglicéridos en la semana 6 de los Grupos 5 (20% A¹) y 9 (10% A¹ sin colesterol agregado) han incrementado de la semana 0 y Grupos 4 (10% A¹) y 10 (10% A² sin colesterol agregado) no ha mostrado cambio. Los niveles de triglicérido en el suero para todos los otros Grupos han caído de aquellos en la semana 0.

Efecto de Dieta en LDL

En todos los Grupos con colesterol alimentario, los niveles LDL en el suero son significativamente mayores que el Grupo 1 (solo suero) o Grupos 9 (A1) y 10 (A2) con colesterol no alimentario. Grupo 9 (A¹ con colesterol no alimentario) no es significativamente diferente del Grupo 1, pero el Grupo 10 (A2 con colesterol no alimentario) es significativamente más bajo. También los niveles de LDL del Grupo 10 son significativamente más bajos que aquellos para el Grupo 9. Todos los Grupos con colesterol alimentario (Grupos 2-8) no son significativamente diferentes uno del otro.

Así, los niveles de LDL en el suero siguiendo el mismo patrón como el colesterol de suero indican que la adición de colesterol alimentario ha incrementado los niveles LDL en el suero en todos los grupos apropiados, mientras que en la variante caseína A² en la ausencia de colesterol alimentario, produce LDL más bajo en el suero que A¹ o solo suero.

Efecto de dieta on HDL

El HDL en el suero siguen el mismo patrón como el LDL en el suero con colesterol alimentario (Grupos 2-8) originando niveles significativamente elevados que aquellos sin colesterol agregado (Grupos 1, 9 y 10). El Grupo 9 no es significativamente diferente del Grupo 1, pero es significativamente mayor que el Grupo 10, que a su vez es significativamente más bajo que todos los Grupos excepto el Grupo 1. La β -caseína A² sin colesterol alimentario produce una HDL disminuido en el nivel de suero que A¹.

Efecto de la Dieta en proporción LDL a HDL

Las proporciones LDL a HDL se determinan al dividir los niveles de conejo individuales en el suero por los mismos niveles de conejo del HDL en el suero. La media LDL:HDL para cada Grupo luego se determina. Se ha encontrado que el LDL:HDL del Grupo 10 (10% de β -caseína A² solo) es significativamente más bajo que todos los otros grupos que incluyen solo suero y β -caseína A¹ sola. Las proporciones LDL a HDL de todos los Grupos con colesterol alimentario (Grupos 2-8) no son significativamente diferentes uno del otro. Como con los niveles de LDL en el suero y niveles de HDL, existe una tendencia para niveles más grandes con dosis más grandes de β -caseína A¹ y niveles más bajos de β -caseína A².

Efecto de dieta en Homocisteína

Por la semana 6, los niveles de homocisteína en el suero han cambiado solo levemente de aquellos en la semana 0 sin diferencia significativa demostrada entre los grupos experimentales.

ES 2 329 031 T3

Efecto de dieta en Aterosclerosis

Los conejos del Grupo 1 alimentados con 20% de suero tienen 0% de área de superficie aórtica cubiertos por placa: todos los otros grupos tienen alguna placa, que incluyen aquellos del Grupo 10, aunque este no es significativamente mayor que el Grupo 1. Solo los Grupos 1 y 10 son significativamente más bajos que el Grupo 3, que también es considerablemente más alto que los Grupos 2-9, sin embargo, la variación entre conejos dentro de este Grupo es mayor, con un rango entre 2.8 y 18.4%. Se excluyen tres conejos de estos cálculos ya que se consideran valores extremos atípicos.

La aorta torácica del Grupo 1 tiene 0% de la superficie de área cubierta por estrías de grasa. Todos los otros Grupos tienen algunas lesiones, que incluyen los Grupos 9 (A1) y 10 (A2) con colesterol no alimentario. Los Grupos 9 y 10 no son significativamente diferentes uno del otro. Para ambos A¹ y A² con colesterol alimentario, existe una tendencia a disminuir el porcentaje de las lesiones con concentración incrementadas de variante de caseína, pero esto no es significativo. El Grupo 3 es considerablemente mayor que todos los otros, pero no significativamente diferente. De los seis conejos en este Grupo, tres tienen un alto porcentaje de área de superficie cubierta por placa y tres tienen bajos valores.

La aorta abdominal aislada de los animales que comen A² en la ausencia de colesterol alimentario (Grupo 10) tiene solo un área de superficie mínima cubierta por placa y no es significativamente diferente del Grupo 1 (solo suero) que tiene 0% cubierto por placa. El Grupo 10 es significativamente más bajo que todos los otros Grupos que incluyen Grupo 9 (A1, colesterol no alimentario). El Grupo 3 (5% de A¹ con colesterol alimentario) es significativamente mayor que el Grupo 2 con 20% de suero y colesterol alimentario.

Así, ambas variantes de caseína sin colesterol alimentario producen estrías de grasa más extensas que solo suero pero A² es menos aterogénico que A¹. En adición, A¹ es más aterogénico que A² en la presencia de colesterol alimentario.

Proporciones íntimas a medias

Con 20% de suero solo (Grupo 1) no existe engrosamiento íntimo del arco aórtico. De manera similar, en la presencia de 10% de A² con colesterol no alimentario (Grupo 10) o con colesterol alimentario y 5% o 20% de A² (Grupos 6 y 8), la proporción de íntima media a media es 0. El Grupo 7 (10% de A² con colesterol alimentario) tiene una proporción de íntima media a media de solo 0.01, con cuatro de los seis conejos que tienen 0%. Todos los grupos A¹ (ambos con y sin colesterol alimentario) tienen proporciones íntimas a medias más altas que los grupos alimentados con caseína A² y tiene proporciones íntimas a medias no significativamente diferentes del Grupo 2 (20% de suero con 0.5% de colesterol). En efecto, 10% de A¹ en la ausencia de colesterol alimentario produce la proporción de íntima a media como el 20% de suero con 0.5% de suero con 0.5% de colesterol alimentario (0.03).

Así, en relación con el grosor de las lesiones de estría grasas en el arco aórtico, la caseína A¹, aún en la ausencia de colesterol alimentario, produce lesiones similares a las que se producen por 0.5% de colesterol. En contraste A², en la presencia y ausencia de colesterol alimentario, parece ser altamente ateroprotectora.

El daño por catéter de globo a la arteria carótida derecha t = 0 induce un engrosamiento neointimo hiperplásico en todos los conejos por 6 semanas. La medición de las proporciones íntimas a medias muestran que hay un leve incremento, pero no significativo en el engrosamiento neointimo en el Grupo de conejos 2 (20% de suero con 0.5% de colesterol) comparado con Grupo 1 (20% de suero solo). En forma similar, los grupos alimentados con 5, 10 y 20% de A¹ más 0.5% de colesterol tienen espesor, pero no neointimas significativamente diferentes del Grupo 1. Los Grupos alimentados con 5, 10 y 20% de A² más 0.5% de colesterol todos tienen neointimas más delgadas que sus contrapartes A¹, pero de nuevo esto no es significativo. Similarmente, en la ausencia de colesterol alimentario la proporción íntima a media en animales alimentados con A² (Grupo 10) es más baja que en el Grupo 9 alimentado con A¹.

No existe engrosamiento neointimo observado en todos los vasos de control.

Aunque la invención se ha descrito por vía de ejemplo, se debe apreciar que variaciones y modificaciones se pueden hacer sin apartarse del alcance de las reivindicaciones. Adicionalmente, en donde existen equivalentes conocidos para características específicas, se incorporan tales equivalentes como específicamente referidos en esta especificación.

60 Aplicabilidad industrial

El consumo de β -caseína A² es útil para reducir LOS niveles de colesterol en el suero, niveles de triglicéridos circulantes, concentraciones de LDL y Así proporciones LDL:HDL, y niveles de suero de apolipoproteína B. El método de la invención es por lo tanto útil para prevenir o tratar varias enfermedades asociadas con niveles de colesterol en el suero de mamíferos, niveles de colesterol LDL y niveles de triglicéridos. Tales enfermedades incluyen hipercolesterolemia, hiperlipidemia, y aterosclerosis. La invención también proporciona un complemento alimenticio que contiene β -caseína A².

ES 2 329 031 T3

REIVINDICACIONES

5 1. β -caseína para uso en el tratamiento de hipercolesterolemia, hiperlipidemia y aterosclerosis al reducir el nivel de suero en un mamífero de uno cualquiera o más de los siguientes:

a) colesterol;

b) colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) relativo a colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL);

10 c) colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL);

d) colesterol de lipoproteína de muy baja densidad (LDL);

15 e) apolipoproteína B; y

f) triglicéridos

en donde la β -caseína está comprendida de por lo menos 95% de β -caseína A².

20 2. El uso como se reivindica en la reivindicación 1 en donde la β -caseína está comprendida solamente de β -caseína A².

25 3. El uso como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2 en donde la composición es un alimento o producto alimenticio.

4. El uso como se reivindica en la reivindicación 3 en donde el alimento o producto alimenticio es leche o un producto que contiene o procesado de leche.

30 5. El uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la composición es un complemento alimenticio.

35 6. El uso como se reivindica en la reivindicación 5 en donde el complemento alimenticio es un nutracéutico que se ingiere para optimizar cualquiera de uno o más del grupo que consiste de desempeño durante el ejercicio, pérdida de peso, ganancia de peso, construcción muscular y reparación muscular.

7. El uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la composición es leche que contiene β -caseína en donde la β -caseína está comprendida de por lo menos 95% de β -caseína A².

40 8. El uso como se reivindica en la reivindicación 7 en donde la β -caseína está comprendida solamente de β -caseína A².

45 9. El uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde la composición se ha formado por la adición de una cantidad de β -caseína A² suficiente para alterar los niveles de colesterol en el suero y/o niveles de triglicérido en el suero es un humano.

50 10. El uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la β -caseína A² se obtiene de la leche de ganado bovino o de la leche de yaks, búfalos, ovejas o cabras.

50

55

60

65

Figura 1

A

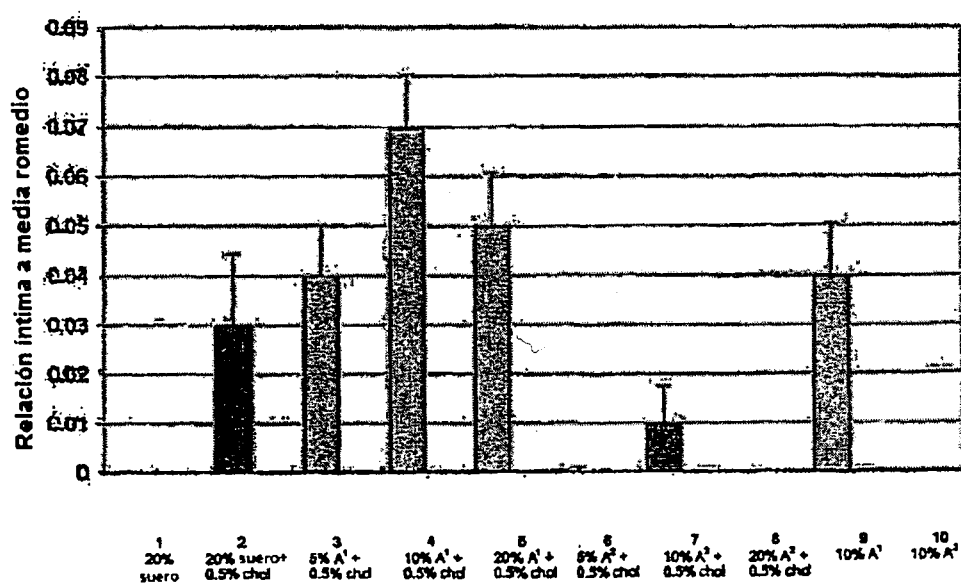


Tabla de significados (P>0.05)

Grupo	Significativamente diferente del Grupo
1	2, 4, 5
2	1, 5, 8, 10
3	1, 5, 8, 10
4	1, 5, 8, 10
5	3, 4, 6
7	8, 4, 5
8	3, 4, 5
9	1, 5, 8, 10
10	3, 4, 5

Figura 2

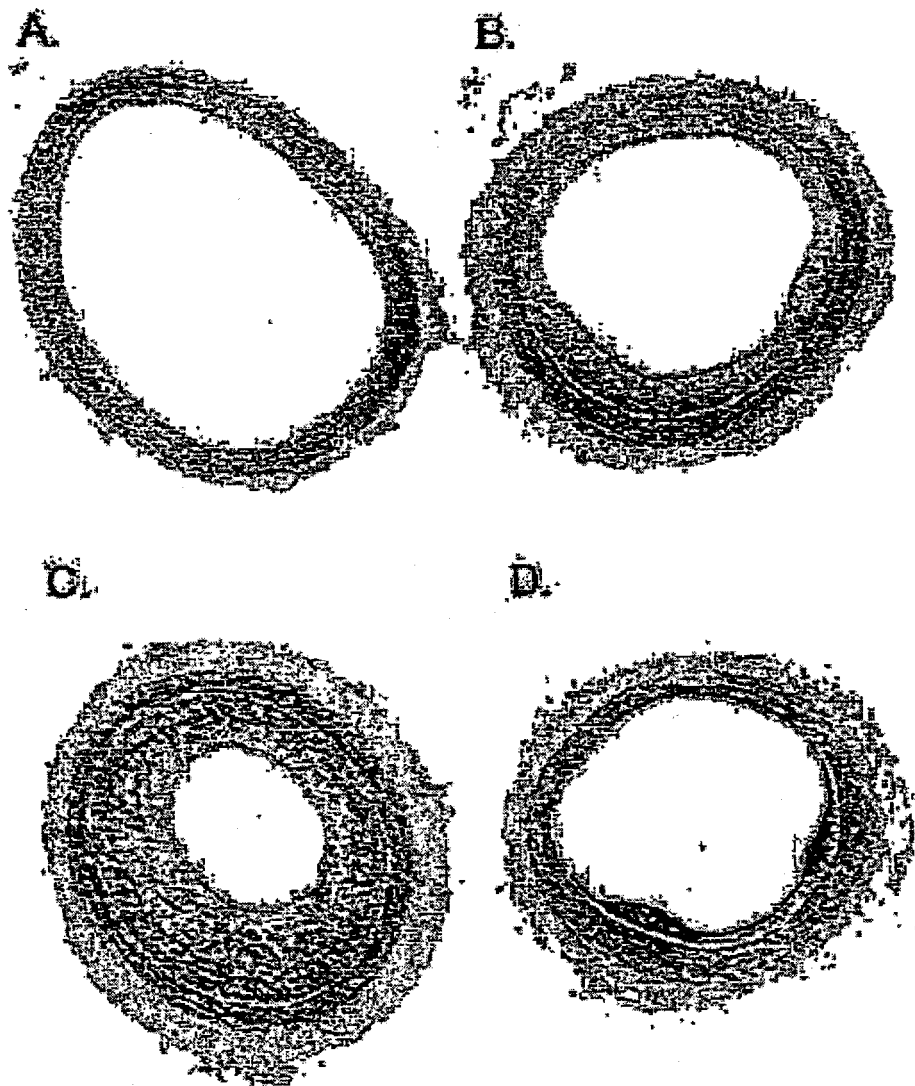


Figura 3

A.

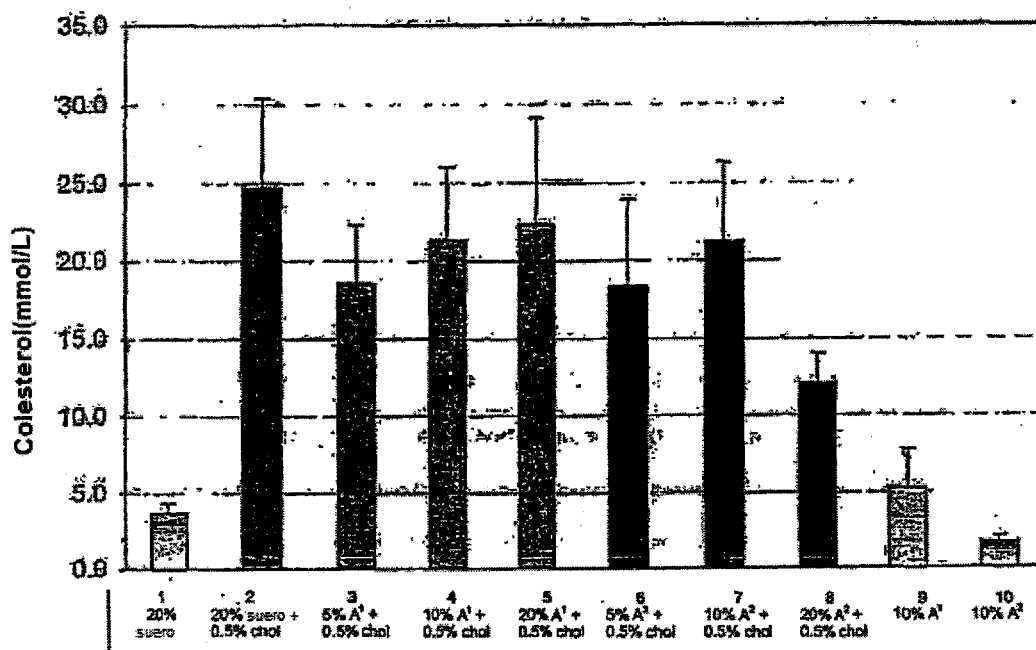


Tabla de significados (P<0,05)

Grupo	Significativamente diferente del Grupo
1	2, 4, 5, 7, 10
2	1, 9, 10
3	1, 9, 10
4	1, 9, 10
5	1, 9, 10
6	1, 9, 10
7	1, 9, 10
8	1, 9, 10
9	2, 4, 5, 7, 10
10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Figura 4

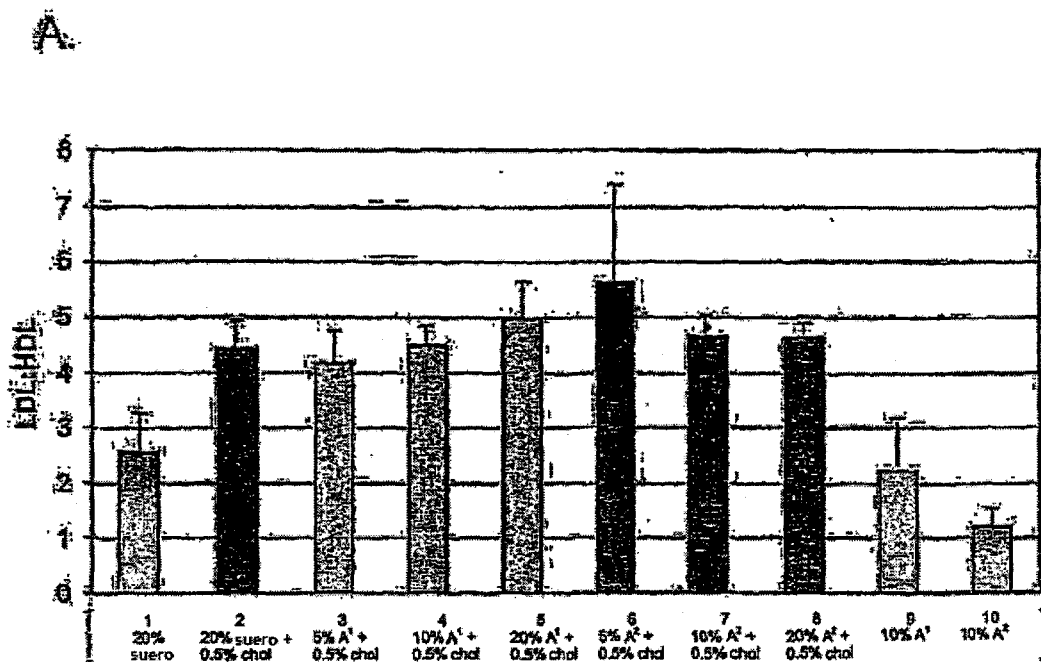


Tabla de significados (P>0.05)

Grupo	Significativamete diferente del Grupo
1	10
2	10
3	10
4	10
5	10
6	10
7	10
8	10
9	10
10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9