

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 269 943**

51 Int. Cl.:

C08B 30/18 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

A61M 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2003 E 03291325 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **07.10.2015 EP 1369432**

54 Título: **Polímeros solubles de glucosa altamente ramificados y su procedimiento de obtención**

30 Prioridad:

06.06.2002 FR 0206952

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

25.05.2016

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
62136 LESTREM, FR**

72 Inventor/es:

**BACKER, DANIEL y
SANIEZ, MARIE-HÉLÈNE**

ES 2 269 943 T5

DESCRIPCIÓN

Polímeros solubles de glucosa altamente ramificados y su procedimiento de obtención

- 5 La invención tiene por objeto polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que poseen un contenido de azúcares reductores inferior al 1% y presentan una proporción de enlaces glucosídicos α -1,6 especialmente elevada, comprendida entre el 12 y el 30%, para una distribución de peso molecular muy estrecha, comprendida entre $0,3 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^5$ daltones y una osmolalidad muy baja, comprendida entre 1 y 15 mOsm/kg.
- 10 Estos polímeros solubles de glucosa ramificados presentan por otra parte una escasa viscosidad y una ausencia de retrogradación, incluso después del almacenamiento en frío después de largos periodos de tiempo.
- La invención se refiere también a un procedimiento de fabricación de dichos polímeros solubles de glucosa altamente ramificados.
- 15 La invención se refiere, además, a composiciones que comprenden dichos polímeros solubles de glucosa ramificados que es posible utilizar en numerosas aplicaciones industriales y especialmente en las industrias alimentarias y sobre todo farmacéuticas.
- Los polímeros de glucosa clásicamente accesibles industrialmente están especialmente preparados mediante hidrólisis de los almidones naturales o híbridos y de sus derivados.
- 20 Los hidrolizados de almidón estándares se producen por lo tanto mediante hidrólisis ácida o enzimática de almidones de cereales o de tubérculos. Son de hecho una mezcla de glucosa y de polímeros de glucosa, de peso molecular extremadamente variado.
- Estos hidrolizados de almidón (dextrinas, maltodextrinas...) producidos en la industria (con un cierto Grado de Polimerización o GP medio) consisten en una amplia distribución de sacáridos que contienen a la vez estructuras lineales (enlaces glucosídicos α -1,4) y ramificadas (enlaces glucosídicos α -1,6).
- 25 Estos hidrolizados de almidón, especialmente las maltodextrinas, se utilizan como transportador o agente de carga, agente texturizante, soporte de atomización, agente de sustitución de materias grasas, agente filmógeno, agente de control de congelación, agente anticristalizante o por su aporte nutricional.
- Por otra parte, el experto en la materia sabe que la composición sacarídica de las maltodextrinas determina a la vez sus propiedades físicas y biológicas.
- 30 Por ello, su higroscopicidad, su fermentescibilidad en los productos alimentarios, su viscosidad, su carácter edulcorante, su estabilidad, su carácter gelificante y su osmolalidad, son criterios clásicamente determinados para sus diferentes campos de aplicación.
- Los conocimientos básicos del comportamiento fisicoquímico de estos sacáridos conducen de este modo a integrarlos, por ejemplo, en las bebidas para deportistas, las bebidas líquidas con solubilidad limitada, los líquidos parenterales y enterales o en alimentos para diabéticos.
- 35 Por este motivo, para estas diferentes aplicaciones, se requieren diversas propiedades físicas o biológicas.
- Se conoce, por ejemplo, que la proporción de absorción de estos sacáridos está determinada por la proporción de evacuación gástrica y la proporción de adsorción intestinal, cuyo control está garantizado por la osmolalidad de dichos sacáridos.
- 40 A nivel intestinal, las maltodextrinas son hidrolizadas por la α -amilasa pancreática, lo que conduce a reducir su dimensión hasta las dextrinas límites, y un cierto número de enzimas ligadas a la mucosa intestinal (maltasa, sucrasa y α -dextrinasa) siguen hidrolizando los sacáridos lineales y ramificados en glucosa.
- Si la glucosa pasa fácilmente la barrera intestinal (difusión pasiva), no ocurre lo mismo con los sacáridos de bajo GP. De esta manera, algunos oligosacáridos lineales serán adsorbidos más rápidamente que algunos oligosacáridos ramificados, aunque la maltosa y la maltotriosa sean absorbidas más rápidamente que la glucosa.
- 45 Las bacterias del colon van a fermentar todos los hidratos de carbono que no son adsorbidos por el intestino delgado. La fermentación excesiva por estas bacterias conducirá a trastornos intestinales tales como calambres y flatulencia.
- Se sabe también que la osmolalidad influye en la proporción de adsorción / secreción de agua en el intestino delgado. Cuando mayor es la osmolalidad de un compuesto, más induce una entrada de fluido en el intestino y

conduce a desarreglos graves del intestino (diarrea osmótica), con pérdida concomitante de fluidos y de electrolitos.

La osmolalidad de una solución es igual a la cantidad de moles disueltos por kg de agua, lo cual implica que a igual concentración en peso seco, la osmolalidad de una maltodextrina clásica aumenta con la reducción de su GP.

- 5 De manera general, las maltodextrinas son bien absorbidas por el cuerpo humano, pero en condiciones físicas más extremas, tales como el ejercicio deportivo o la enfermedad, hay que garantizar un mejor aporte en hidratos de carbono.

10 Por ejemplo, en los deportistas, una bebida consumida durante una actividad física que requiere mucho esfuerzo debe aportar instantáneamente la energía y el agua necesaria para compensar la pérdida de fluido por perspiración.

De lo enunciado anteriormente se deriva que una composición equilibrada en hidratos de carbono es esencial para obtener dicho resultado.

- 15 Una solución clásicamente propuesta para la bebida óptima es elegir oligosacáridos cortos lineales de GP 3 a 6, puesto que son absorbidos a la frecuencia más elevada, a la vez que mantienen la osmolalidad a un nivel moderado, impidiendo de este modo la pérdida de los fluidos y los efectos secundarios tales como la diarrea y los calambres.

Sin embargo, estas composiciones presentan el inconveniente de constituir fuentes de energía asimilables demasiado instantáneamente por el organismo, lo que se traduce por dificultades para mantener un aporte energético constante durante de largos periodos de tiempo.

- 20 Se ha propuesto de este modo en la solicitud de patente WO 95/22.562 nuevos derivados de almidón destinados al suministro de energía para la preparación o después de un esfuerzo físico.

Se trata de dextrinas, caracterizadas por su peso molecular comprendido entre $15 \cdot 10^3$ y 10^7 daltones, y un grado de ramificación glucosídica 1,6 comprendido entre el 2 y el 8%, preferiblemente comprendido entre el 3 y el 7%, que garantizan una renovación de las reservas energéticas en forma de glicógeno.

- 25 En su forma líquida, estas dextrinas particulares pasan al intestino delgado después de una evacuación gástrica rápida. Esta vía está, por otra parte, controlada por la osmolalidad de dichas dextrinas.

30 Una osmolalidad elevada significa aquí que las sustancias de bajo peso molecular se unen al agua, lo que dificulta el transporte del agua y de los nutrientes en la célula. La osmolalidad de la sangre es de aproximadamente 300 mOsm/l, y con objeto de facilitar el transporte de nutrientes, es deseable que la osmolalidad de la sustancia esté especialmente por debajo de este valor.

Una dextrina según el documento WO 95/22.562, de un peso molecular medio de aproximadamente 720.000 y de un grado de ramificación del 4% aproximadamente, es descrita como presentando una osmolalidad de 20 mOsm/kg sol.

- 35 Sin embargo, estas dextrinas se preparan mediante tratamiento ácido del almidón nativo, más particularmente de la fécula de patata, en condiciones de temperatura elevadas, es decir, de 110 a 140°C y en un tiempo de reacción de 1 a 15 horas, lo que conduce a un grado de ramificación 1,6 que corresponde a la vez a enlaces glucosídicos α -1,6 y β -1,6.

Estos enlaces glucosídicos atípicos no son digeridos por los sistemas enzimáticos del intestino, y pueden conducir a la acumulación de residuos no digeribles que algunas bacterias indeseables van a asimilar.

- 40 En otro campo de aplicación, las maltodextrinas se añaden a menudo a las bebidas para aumentar su viscosidad. Sin embargo, en las que contienen alcohol, el aporte de MD de alto GP puede generar problemas de estabilidad de la mezcla.

45 Otra solución, que consiste en añadir maltosa o glucosa conduce, sin embargo, a aportar un sabor dulce adicional a la mezcla, lo que no siempre es deseado. Además, estos pequeños oligosacáridos pueden servir de sustratos de fermentación para microorganismos indeseables.

Las maltodextrinas más adaptadas a este campo de aplicación deben, por lo tanto, conciliar y equilibrar los parámetros de "no dulce", de viscosidad y de estabilidad.

En el campo de las soluciones parenterales, se conciben soluciones nutritivas para mantener un paciente en buen estado de salud y para proporcionarle los nutrientes cuando no puede ser alimentado por su sistema digestivo normal.

5 Puesto que las soluciones son directamente aportadas por vía venosa, deben ser isotónicas y el aporte de glucosa está limitado.

Para proporcionar una energía diaria de 10.000 kJ, se describe en un artículo de FOOD Science Technology de 1999, pp. 345-355 por MARCHAL *et al.*, que sería necesario administrar por vía intravenosa 14 litros de solución isotónica de glucosa (el 5% en peso/volumen de glucosa), lo que sobrepasa ampliamente las capacidades humanas.

10 El aporte de soluciones más concentradas de glucosa o fructosa (del 10% al 20% en peso/volumen) es posible, pero no para largos periodos.

15 Es posible administrar sacáridos lineales con un GP comprendido entre 2 y 5, puesto que estos sacáridos son hidrolizados por maltasas en el riñón, y que la glucosa liberada es entonces reabsorbida. De este modo, la utilización de oligosacáridos lineales cortos permite aportar suficiente energía a una solución isotónica, sin sobrehidratar al paciente.

Por otra parte, los oligosacáridos lineales de un GP inferior a 7 al ser estables en solución durante largos periodos de tiempo, se elige clásicamente hacer variar el GP entre 2 y 7 para permitir aportar constantemente a los pacientes, en estos periodos largos, toda la energía necesaria.

20 Pero esta solución no es totalmente satisfactoria, y no considera más que la explotación de estructuras glucosídicas lineales.

En cuanto a la nutrición enteral, se refiere a bebidas que pueden ser ingeridas oralmente o administradas por vía tubular en el estómago o el intestino delgado.

Para estos fluidos enterales, el mayor problema es la diarrea, debida a una osmolalidad demasiado fuerte. En principio, la misma solución que la encontrada para los deportistas también se puede aplicar aquí.

25 De manera clásica, se utilizan maltodextrinas que contienen una mezcla compleja de sacáridos lineales y ramificados, con un GE de 10 a 20, pero sin ser totalmente satisfactorio.

Los especialistas en estos campos de aplicaciones buscan la solución a estos problemas técnicos en la elaboración de estructuras ramificadas derivadas del almidón.

30 La amilopectina, principal constituyente del almidón, se organiza alrededor de enlaces α -1,4 lineales y de enlaces α -1,6 que se ramifican en la misma. El conocimiento de las microestructuras ha puesto en evidencia que estos dos tipos de enlaces no se encuentran repartidos de manera uniforme, pero que zonas muy densas de enlaces α -1,6 se encuentran junto a zonas constituidas únicamente por enlaces α -1,4.

35 Se ha propuesto, en la patente US 4.840.807, o la solicitud de patente JP 11/187.708, extraer únicamente las zonas densas en enlaces α -1,6, como fuente de glúcidos de absorción lenta, en el sentido de que los enlaces α -1,6, son más difíciles de degradar que los enlaces α -1,4.

Por lo tanto se han desarrollado dos familias de productos. La primera se refiere a las dextrinas límites preparadas mediante la degradación de las zonas de enlaces α -1,4 mediante una única α -amilasa, y las dextrinas preparadas mediante la degradación de las zonas de enlaces α -1,4 por la acción simultánea de una α -amilasa y de una β -amilasa.

40 La resistencia de estas dextrinas límites a las enzimas digestivas humanas permite utilizarlas para regular la digestión, pero también para controlar la glicemia (aplicación para la alimentación de los diabéticos). Este efecto es atribuido a un retraso de la velocidad de adsorción digestiva.

Sin embargo, estos compuestos tienen el inconveniente de presentar un peso molecular muy bajo (comprendido entre 10.000 y 55.000 daltones), lo que limita su explotación en otros campos de aplicación.

45 La patente EP 207.676 muestra que para un uso en diálisis peritoneal continua y ambulatoria, se prefieren hidrolizados de almidón que forman soluciones límpidas e incoloras al 10% en agua, con un peso molecular de $5 \cdot 10^3$ a 10^6 daltones y un índice de polimolecularidad o lp bajo.

Esto se traduce por composiciones que contienen mayoritariamente polímeros de glucosa de alto peso molecular comprendido entre $5 \cdot 10^3$ y $5 \cdot 10^5$ daltones), que contienen muy poca o ninguna glucosa u oligosacáridos de GP inferior o igual a 3, y sin ninguno o muy pocos polímeros de glucosa de peso molecular superior a 10^6 daltones.

5 Se concibe, en efecto, fácilmente, para esta aplicación que los monómeros o polímeros de bajo peso molecular atraviesan rápidamente la pared peritoneal y carecen de este modo de todo interés duradero para la creación de un gradiente de presión osmótica, y que los polímeros de muy alto peso molecular, desprovistos de poder osmótico, deben evitarse e incluso proibirse puesto que son potencialmente peligrosos si precipitasen después de su retrogradación.

10 La diálisis peritoneal consiste en introducir una solución de diálisis en la cavidad peritoneal mediante un catéter. Al cabo de cierto tiempo, se produce un intercambio de solutos entre el dializado y la sangre. La utilización de un agente osmótico adecuado permite el drenaje del agua excedente, desde la sangre hacia el dializado.

15 El procedimiento estándar en diálisis peritoneal para eliminar el exceso de agua (ultrafiltración) y de solutos del organismo en caso de deficiencia renal consistía en utilizar una solución de diálisis realizada hipertónica respecto del plasma mediante adición de glucosa como agente osmótico. El flujo a través de una membrana semipermeable ideal está principalmente determinado por el número total de partículas de soluto (osmolalidad) presentes en la solución, independientemente de su tamaño. Por el contrario, en el caso de una membrana biológica como la membrana peritoneal, el flujo depende únicamente de los solutos que no atraviesan o atraviesan poco la membrana y no está necesariamente ligado a la osmolalidad total de la solución. Además, la capacidad de los solutos para atravesar la membrana está caracterizada por la forma de las moléculas y su carga iónica, así como por su tamaño.

20 La elección de un agente osmótico ideal es delicada: este último debe permitir un gradiente osmótico para desplazar el agua y las sustancias tóxicas desde la sangre hacia la solución de diálisis a través del peritoneo. También debe ser no tóxico y biológicamente inerte, a la par que metabolizable por el organismo, siendo una parte del mismo asimilada en la sangre. No debe atravesar la membrana peritoneal demasiado rápido, para mantener duraderamente un gradiente de ultrafiltración sin acumular sustancias indeseables en la sangre.

En su patente EP 667.356, la sociedad solicitante ha propuesto un procedimiento de fabricación, a partir de almidón ceroso, un hidrolizado de almidón completamente soluble en agua y de bajo índice de polimolecularidad, inferior a 2,8, con un peso molecular comprendido entre $5 \cdot 10^3$ y $1 \cdot 10^6$ daltones.

30 Este procedimiento consiste en hidrolizar por vía ácida una leche de almidón constituida exclusivamente de amilopectina, y en completar esta hidrólisis ácida con una hidrólisis enzimática con la ayuda de α -amilasa bacteriana, y cromatografiar sobre resinas catiónicas fuertes macroporosas en forma alcalina o alcalinotérrica.

35 Cabe resaltar que en aquella época, la sociedad solicitante recomendaba únicamente la utilización de los almidones casi exclusivamente compuestos de amilopectina y habitualmente denominados almidones waxy o almidones cerosos como materia prima en dicho procedimiento, sin que sean apropiados los almidones o féculas que contienen una proporción no despreciable de amilosa.

40 Este hidrolizado de almidón, también denominado icodextrina, ha permitido una disminución significativa de la absorción diaria de glucosa previamente utilizada como agente osmótico en las soluciones para diálisis, constituyendo de este modo una potencial ventaja para el tratamiento de los pacientes diabéticos y obesos para los cuales la carga calórica es un factor crítico. Esto podría, sin embargo, ser mejorado aun más utilizando un agente osmótico menos glicemiante, y cuyo poder osmótico durase más tiempo, lo que permitiría aligerar significativamente el proceso del tratamiento de diálisis. En efecto, al mejorar el rendimiento de los dializados, la frecuencia de cambio de las bolsas de diálisis se reduciría, lo que constituye una mejora cierta de la calidad de vida del paciente.

De este modo, el glúcido ideal en diálisis peritoneal debería:

- 45
- ser soluble en agua
 - ejercer una presión osmótica
 - tener una baja viscosidad
 - inducir una baja cinética de aparición de glucosa en la circulación sistémica
 - ser hidrolizado lentamente por la amilasa para ejercer una presión osmótica duradera.
- 50

En efecto, respecto de este último punto, el devenir de los agentes osmóticos administrados en solución en la cavidad peritoneal en pacientes con insuficiencia renal está determinado por su estabilidad en el líquido peritoneal, la importancia de la absorción en la circulación sistémica y la velocidad de hidrólisis por la amilasa. Ahora bien, los agentes osmóticos de la técnica anterior presentan el inconveniente de ser hidrolizados rápidamente.

55

Asimismo, los almidones denominados resistentes han sido propuestos como agentes reguladores de la glicemia. Ahora bien, estos no son generalmente estables en las composiciones, no pueden ser esterilizados, lo que genera al final una pérdida de producto, y estos pueden ser fermentados y no aportan por lo tanto la parte calórica esperada.

5

De todo lo anterior, resulta que existe por lo tanto una necesidad no satisfecha de disponer de polímeros de glucosa que presentan propiedades notables, especialmente en términos de estabilidad, solubilidad y eventualmente de viscosidad, proporcionando por ello, incluso a los productos que los contienen, mayores capacidades de vida útil, de digestibilidad controlada, lo que permite el uso en campos tan variados como la diálisis peritoneal, la nutrición enteral o parenteral, como inhibidor y/o regulador de la glicemia, como aporte energético durante actividades físicas y como regulador de la digestión.

10

La sociedad solicitante ha tenido el mérito de conciliar todos estos objetivos considerados hasta entonces como difícilmente conciliables, imaginando y elaborando, a costa de numerosas investigaciones, nuevos polímeros solubles de glucosa altamente ramificados.

15

Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención, con un contenido de azúcares reductores inferiores al 11%, están caracterizados porque poseen una proporción de enlaces glucosídicos α -1,6 comprendida entre el 12 y el 30%, un peso molecular determinado mediante difusión de la luz de un valor comprendido entre $0,3 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^5$ daltones, y una osmolalidad, determinada según un ensayo A, de un valor comprendido entre 1 y 15 mOsm/kg.

20

Los polímeros solubles de glucosa ramificados según la invención presentan un bajo contenido en azúcares reductores.

25

La determinación del poder reductor de los polímeros de glucosa ramificados según la invención por cualquier procedimiento conocido por otra parte, por el experto en la materia, conduce a valores inferiores al 1%.

La proporción de enlaces glucosídicos α -1,6 de los polímeros solubles de glucosa ramificados según la invención está determinada mediante análisis RMN del protón. La proporción de ramificación se expresa en porcentaje, correspondiente a la cantidad de señal del protón llevado por el C1 de un residuo anhidroglucosa que se une a otro residuo anhidroglucosa mediante un enlace α -1,6, cuando se ha dado un valor de 100 al conjunto de las señales de los protones llevados por todos los C1 de los residuos glucosa de dichos polímeros solubles de glucosa.

30

En estas condiciones, se determina que los polímeros de glucosa solubles altamente ramificados según la invención presentan una proporción de enlaces α -1,6 incluida entre el 12% y el 30%.

35

Este contenido de enlaces glucosídicos α -1,6 confiere a cualquier polímero de glucosa altamente ramificado según la invención una estructura particular, en términos de grado de ramificación y/o de longitudes de cadenas ramificadas respecto del almidón o del derivado de almidón del que procede.

40

Este contenido particularmente elevado de enlaces glucosídicos α -1,6 hace difícilmente digestibles los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención, lo que contribuye a poder utilizarlos como agente regulador de la digestión y como agente inhibidor de la glicemia, como se ha expuesto anteriormente.

45

Por lo tanto, pueden proponerse útilmente a los diabéticos o a los sujetos predispuestos, como alimentos, bebidas o coadyuvantes de nutrición que tienen por función inhibir la elevación de la glicemia.

Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención presentan también una ausencia de retrogradación en solución acuosa y una notable estabilidad.

50

Esta propiedad destina naturalmente los polímeros de glucosa ramificados según la invención a composiciones utilizables en la industria alimentaria, presentando entonces estabilidades elevadas durante el almacenamiento.

Otra ventaja de la invención es permitir la obtención de un producto acabado utilizable, por ejemplo, como aglomerante instantáneo en productos refrigerados o congelados.

55

La determinación de las masas moleculares de los polímeros solubles de glucosa ramificados según la invención se realiza mediante la medición de las masas moleculares medias en peso (Mw).

60

Este valor se obtiene mediante cromatografía de exclusión estérica en columnas PSS SUPREMA 100 y PSS SUPREMA 1000 montadas en serie y acopladas a un detector de difusión de la luz.

Los polímeros de glucosa ramificados según la invención presentan entonces un valor de Mw comprendido entre $0,3 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^5$ daltones.

65

Los polímeros de glucosa solubles según la invención presentan también una osmolalidad notablemente baja.

El ensayo A consiste en determinar la osmolalidad de una solución que contiene 100 g en peso seco de polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención colocados en 1 kg de agua.

5

La medición de la osmolalidad de esta solución se efectúa a continuación en un osmómetro MARK 3 de FISKE® ASSOCIATES, siguiendo las especificaciones del constructor.

10

Los polímeros de glucosa ramificados según la invención presentan entonces un valor de osmolalidad notablemente bajo comprendido entre 1 y 15 mOsm/kg.

No existen, según la sociedad solicitante, polímeros de glucosa que posean semejante valor de osmolalidad, para productos que presentan, por otra parte, una proporción de ramificación y un peso molecular como los definidos.

15

En efecto, mediciones comparativas efectuadas sobre maltodextrinas clásicas que presentan un equivalente dextrosa (DE) comprendido entre 5 y 20 muestran valores de osmolalidad comprendidos entre 25 y 85 mOsm/kg.

20

Otras mediciones, efectuadas sobre dextrinas límites como las definidas anteriormente mediante tratamiento de almidón licuado con α -amilasa, comercializadas con el nombre BLD 8 por SANMATSU, presentan para un peso molecular comprendido entre 0,4 y $0,5 \cdot 10^5$ daltones y una proporción de ramificación α -1,6 comprendida entre el 8 y el 9%, un valor de osmolalidad de más de 35 mOsm/kg.

25

Este valor de osmolalidad muy bajo confiere a los polímeros solubles altamente ramificados según la invención propiedades que les permiten ser aplicados en preparaciones destinadas a los deportistas, para renovar las fuentes de energía que necesitan para esfuerzos físicos durante largos periodos de tiempo.

Pero también y sobre todo, estas composiciones pueden utilizarse ventajosamente para pacientes que no pueden alimentarse normalmente, en el marco de nutrición enteral y parenteral.

30

Por otra parte, asociados a esta propiedad de baja osmolalidad, su ausencia de retrogradación, su perfil de peso molecular y su bajo índice de polidispersidad, hacen de estos polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención perfectos candidatos como agentes osmóticos para aplicaciones en diálisis peritoneal, como se mostrará mediante ejemplos más adelante. La solicitante ha demostrado, por otra parte, que estos polímeros según la invención presentan una resistencia a la alfa-amilasa que aporta ventajas significativas respecto de los polímeros de la técnica anterior, para un peso molecular similar, puesto que son menos glicemiantes y presentan un poder osmótico que dura más tiempo, permitiendo su uso en los tratamientos de diálisis de larga duración.

35

De manera ventajosa, los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención pueden clasificarse en tres subfamilias en función de su osmolalidad.

40

La primera subfamilia cubre polímeros altamente ramificados que presentan, para un Mw determinado mediante difusión de la luz de un valor comprendido entre $0,5 \cdot 10^5$ y $1,5 \cdot 10^5$ daltones, una osmolalidad, determinada según el ensayo A, al menos igual a 1 e inferior a 2 mOsm/kg.

45

La segunda subfamilia cubre polímeros altamente ramificados que presentan, para un Mw determinado mediante difusión de la luz de un valor comprendido entre $0,5 \cdot 10^5$ y $0,8 \cdot 10^5$ daltones, una osmolalidad, determinada según el ensayo A, al menos igual a 2 e inferior a 5 mOsm/kg.

50

La sociedad ha encontrado, además, polímeros de glucosa ramificados pertenecientes a estas dos subfamilias que presentan, además, una proporción de ramificación α -1,6 notablemente elevada, es decir, comprendida entre el 15 y el 30%

55

La tercera subfamilia cubre polímeros altamente ramificados que presentan, para un Mw determinado mediante difusión de la luz de un valor comprendido entre $0,3 \cdot 10^5$ y $0,7 \cdot 10^5$ daltones, una osmolalidad, determinada según el ensayo A, al menos igual a 5 e inferior a 15 mOsm/kg.

Para preparar los polímeros solubles de glucosa ramificados según la invención, se realiza la sucesión de las siguientes etapas que consisten en:

60

a. preparar una suspensión acuosa de almidón o una solución de derivado de almidón de una materia seca al menos igual al 1% en peso, preferiblemente del 10 al 50% en peso,

b. tratar dicha suspensión o dicha solución con al menos una enzima de ramificación a una temperatura comprendida entre 25°C y 80°C durante un periodo de 1 a 24 horas,

65

c. hacer actuar sobre la suspensión o sobre la solución así obtenida al menos una enzima elegida en el grupo constituido por la α -amilasa, la β -amilasa, la amiloglucosidasa y la α -transglucosidasa,

5 d. efectuar un fraccionamiento con la ayuda de al menos una técnica elegida en el grupo de las separaciones sobre membrana o de las cromatografías, para recuperar las fracciones de alto peso molecular,

e. recoger los polímeros de glucosa ramificados así obtenidos.

10 El almidón es introducido en suspensión, o los derivados de almidón en solución acuosa, con una materia seca al menos igual al 1% en peso, preferiblemente del 10% al 50% en peso.

La elección de un origen, o de una calidad de almidón o de sus derivados particulares, solo reviste una importancia relativa.

15 De hecho, la sociedad solicitante ha puesto a punto un nuevo procedimiento, que permite obtener los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención, por ejemplo aplicables en diálisis peritoneal, que no necesita limitarse a un tipo particular de almidón, en su caso un almidón rico en amilopectina.

20 Se puede por lo tanto elegir almidón natural o híbrido procedente de la patata, patata con alto contenido en amilopectina (fécula cerosa), de guisante, de arroz, de mandioca, de trigo, de maíz, de maíz o de trigo ricos en amilopectina (maíz o trigo cerosos), de maíz con alto contenido en amilosa, de cortes o de fracciones que pueden realizarse u obtenerse a partir de almidones, como la amilosa, la amilopectina, los cortes granulométricos conocidos por el experto en la materia con los vocablos de almidón de trigo "A" y de almidón de trigo "B", y las mezclas de al menos dos cualesquiera de los productos anteriormente mencionados.

Se puede entender que los derivados de almidón sean almidones modificados procedentes de la modificación enzimática, química y/o física, en una o diversas etapas, de este almidón.

25 Los derivados de almidón pueden ser especialmente almidones modificados por una al menos de las técnicas conocidas de eterificación, esterificación, reticulación, oxidación, tratamiento alcalino, hidrólisis ácida y/o enzimática (en el origen de las maltodextrinas y dextrinas).

La sociedad solicitante ha encontrado que los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención se pueden sintetizar fácilmente a partir de almidones, o de sus derivados, que presentan ya una proporción de ramificación al menos igual al 1%.

30 Esta suspensión de almidón, o esta solución de derivados de almidón, pueden ser eventualmente sometida a continuación a un tratamiento mediante cocción particular, que consiste en tratarla a una temperatura superior a 130°C, preferiblemente comprendida entre 140 y 150°C, a una presión de más de 3,5 bares, preferiblemente comprendida entre 4 y 5 bares, durante 30 segundos a 15 minutos, preferiblemente durante 1 a 5 minutos.

35 Este tratamiento se realiza ventajosamente en una estufa de polimerización tubular de doble envoltura calentada mediante fluido térmico, equipamiento fácil de obtener para el experto en la materia.

La segunda etapa del procedimiento según la invención consiste en tratar dicha suspensión de almidón o dicha solución de derivado de almidón con una enzima de ramificación.

40 De manera ventajosa, se utilizan de 50.000 a 500.000 U de enzima de ramificación purificada para 100 gramos en peso seco de almidón o de derivado de almidón, a una temperatura comprendida entre 25 y 95°C, preferiblemente a una temperatura comprendida entre 70 y 95°C durante un tiempo de 1 a 24 horas.

Se entiende por enzimas de ramificación, en el sentido de la invención, las enzimas de ramificación elegidas en el grupo constituido por las enzimas de ramificación del glicógeno, las enzimas de ramificación del almidón y cualesquiera mezclas de estas enzimas.

45 Más particularmente, estas enzimas de ramificación son extraídas de organismos y/o microorganismos elegidos en el grupo constituido por las enzimas de ramificación del glicógeno, las enzimas de ramificación del almidón y cualesquiera mezclas de estas enzimas.

La sociedad solicitante prefiere, para efectuar este tratamiento con una enzima de ramificación, seguir la enseñanza de su solicitud de patente WO 00/18.893.

50 Esta etapa conduce a producir polímeros de glucosa solubles ramificados, pero con un contenido de enlaces glucosídicos α -1,6 a lo sumo igual al 10%.

Para aumentar este valor y alcanzar proporciones de enlaces α -1,6 hasta el 30%, la sociedad solicitante ha descubierto que hace falta realizar un tratamiento enzimático complementario, y es lo que constituye la tercera etapa del procedimiento de obtención de los polímeros de glucosa solubles altamente ramificados según la invención.

- 5 Esta tercera etapa consiste en hacer reaccionar sobre la suspensión o la solución tratada con una enzima de ramificación así obtenida, al menos una enzima elegida en el grupo constituido por la β -amilasa, la amiloglucosidasa, y la α -transglucosidasa.

Las condiciones de acción (temperatura y pH) de las diferentes enzimas aplicadas en el procedimiento según la invención se eligen entre las siguientes (las cantidades se fijan respecto del sustrato considerado, como muestra a
10 continuación):

- α -amilasa: del tipo LYSASE 2000 de GENENCOR, a una temperatura de 55 a 65°C, pH de 6,5 a 6,7, durante 30 minutos a 1 hora (comparativa).
- 15 - β -amilasa: del tipo SPEZYME BBA de GENENCOR, a una temperatura de 40°C, pH de 4,9 a 5, durante 1 hora y 30 minutos a 2 horas.
- amiloglucosidasa: bien del tipo OPTIDEX L300 de GENENCOR, a una temperatura de 55°C, pH de 4,7; bien de tipo A-7420 de SIGMA a una temperatura de 50°C a 60°C, pH de 4,7 a 4,9; durante 1 hora y 30 minutos a 2 horas.
- 20 - α -transglucosidasa: del tipo α -TGase de L-AMANO a una temperatura de 55°C, pH de 5 a 5,2 durante 1 hora.

Las enzimas utilizadas pueden ser de origen bacteriano o fúngico.

25 Al término de este tratamiento complementario, los polímeros de glucosa altamente ramificados solubles se obtienen mezclados con sus productos de degradación enzimática, mayoritariamente constituidos por glucosa, maltosa y/o isomaltosa, como se mostrará más adelante.

La cuarta etapa del procedimiento consiste en efectuar un fraccionamiento con la ayuda de una técnica elegida en el grupo de las separaciones sobre membrana y de las cromatografías, para recuperar las fracciones de alto peso
30 molecular y las fracciones de bajo peso molecular.

Las fracciones de alto peso molecular corresponden a los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención, mientras que las fracciones de bajo peso molecular permiten obtener, con un excelente rendimiento, composiciones enriquecidas en maltosa y/o isomaltosa.
35

De manera ventajosa, se elige una técnica de fraccionamiento en el grupo constituido por la técnica de separación sobre membrana de ultrafiltración y mediante la técnica de separación cromatográfica sobre soporte de tipo gel.

40 En un primer modo de realización de esta cuarta etapa del procedimiento, el fraccionamiento se lleva a cabo con la ayuda de una técnica de separación sobre membrana de ultrafiltración, utilizando una membrana que tiene un umbral de corte al menos igual a 3000 daltones, preferiblemente al menos igual a 5000 daltones.

Las fracciones de alto peso molecular que corresponden a los polímeros de glucosa altamente ramificados, iguales al concentrado del ultrafiltrado representan entonces aproximadamente el 60% de la materia seca aplicada.
45

En un segundo modo de realización de esta cuarta etapa del procedimiento, el fraccionamiento se lleva a cabo con la ayuda de una técnica de cromatografía efectuada sobre una resina del tipo gel.

50 Los perfiles obtenidos permiten la separación de las fracciones que contienen los polímeros de glucosa altamente ramificados con un rendimiento óptimo comprendido entre el 40 y el 45%.

Cualquiera que sea el procedimiento aplicado, los perfiles obtenidos permiten la separación de la fracción polisacáridica de alto peso molecular correspondiente a los polímeros de glucosa ramificados solubles según la invención, de las fracciones oligosacáridicas de bajo peso molecular, constituidas en lo esencial por glucosa y
55 maltosa y/o isomaltosa.

La última etapa del procedimiento según la invención consiste por lo tanto en recoger, por una parte, las fracciones de alto peso molecular correspondientes a los polímeros de glucosa altamente ramificados y, por otra parte, las fracciones de bajo peso molecular enriquecidas en glucosa e isomaltosa y/o maltosa.
60

Los productos de alto peso molecular pueden ser agrupados como tales, o precipitados mediante 3 volúmenes de etanol, purificados y secados al vacío durante 24 horas, o también atomizados, mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia.

En cuanto a las composiciones enriquecidas en maltosa y/o isomaltosa, caracterizadas porque comprenden las fracciones de bajo peso molecular de la etapa d del procedimiento según la invención, podrán utilizarse como tales o ser hidrogenadas mediante cualquier técnica de hidrogenación conocida, por otra parte, por el experto en la materia.

5 Las características fisicoquímicas particulares de los polímeros según la invención permiten sus aplicaciones en las industrias especialmente del papel-cartón, textil, cosmética y, en particular, farmacéutica y alimentaria y, más particularmente aún, en los campos de la nutrición enteral y parenteral, de la diálisis peritoneal como agente osmótico, como agente inhibidor de la glicemia, como aporte energético durante actividades físicas y como agente regulador de la digestión.

10 En lo que respecta el campo particular de la diálisis peritoneal, la solicitante ha descubierto, con la ayuda de un ensayo de resistencia a la alfa-amilasa, que una familia de polímeros según la invención estaba particularmente adaptada a la preparación de soluciones para diálisis peritoneal., como se mostrará más adelante. Estos polímeros son utilizados como agente osmótico.

15 La invención tiene por lo tanto por objeto una solución para diálisis peritoneal caracterizada porque comprende como agente osmótico al menos un polímero soluble altamente ramificado conforme a la invención.

20 Según una variante preferida de la invención, dicho polímero presenta:

- un peso molecular determinado mediante difusión de la luz de un valor comprendido entre $0,3 \cdot 10^5$ y $0,7 \cdot 10^5$ daltones,
- una osmolalidad, determinada según un ensayo A, al menos igual a 5 inferior a 15 mOsm/kg.

25 La solución para diálisis peritoneal según la invención puede, además, comprender electrolitos fisiológicamente aceptables, como el sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro, para evitar la pérdida por transferencia de electrolitos del suero hacia el peritoneo.

30 Esta solución puede presentarse, por ejemplo, en solución acuosa. En este último caso, la solución obtenida mediante disolución en agua de los polímeros altamente ramificados según la invención debe ser límpida e incolora. Esta solución debe estar, preferiblemente, libre de endotoxinas, peptidoglucanos y beta-glucanos, así como de contaminantes nitrogenados procedentes de la materia prima o de las preparaciones enzimáticas utilizadas para su fabricación.

35 Con este fin, los polímeros altamente ramificados aplicados en dicha solución habrán, preferiblemente, sido sometidos a una purificación para quitar cualquier coloración o contaminante indeseable como proteínas, bacterias, toxinas bacterianas, fibras, trazas de metales, etc.

40 Esta etapa de purificación puede realizarse según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

La solución para diálisis según la invención puede comprender también soluciones tampón (especialmente lactato, acetato, gluconato) y otros aditivos como aminoácidos, insulina, polioles como, por ejemplo, sorbitol, eritritol, manitol, maltitol, xilitol.

45 La adición de polioles a la composición, y preferiblemente de polioles apirógenos y libres de las impurezas descritas anteriormente (especialmente endotoxinas y otros residuos de origen bacteriano) permite aumentar la osmolalidad de la solución de manera más ventajosa que la glucosa o la maltosa, debido a su baja caloricidad, de su poder osmótico superior y porque no son reductores.

50 La composición para diálisis según la invención es ventajosa respecto de los productos de la técnica anterior puesto que el agente osmótico que contiene permite ejercer una presión osmótica duradera e induce una baja cinética de aparición de glucosa, a la vez que es estable frente a la retrogradación, respondiendo de este modo a los principales criterios definidos anteriormente.

55 Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de la explicación de los ejemplos no limitativos descritos a continuación.

Ejemplo 1

60 Se prepara una solución de derivados de almidón con un contenido de materia seca del 25% en peso, mediante calentamiento a 80°C con agitación lenta y continua.

65 Se trata en este caso de dos maltodextrinas comercializadas por la sociedad solicitante con el nombre de GLUCIDEX® 2 (sustrato A) y GLUCIDEX® 6 (sustrato B) a 250 g/l.

Esta solución se enfría a 30°C, y el pH es llevado a 6,8 con NaOH 1N.

Estas soluciones se tratan a continuación mediante la enzima de ramificación del glicógeno purificada, extraída del microorganismo *B. stearothermophilus*.

5 Se añade la enzima de ramificación a razón de 1600 U/g de sustrato, y se lleva progresivamente la temperatura a 65°C.

10 La incubación se realiza con agitación moderada durante 4 horas. La reacción se detiene a continuación mediante reducción del pH hasta un valor de 5 y por ebullición durante 6 minutos.

15 La siguiente Tabla I reúne, para los dos sustratos ensayados, los resultados obtenidos en términos de contenidos en enlaces glucosídicos α -1,6, de valores de los pesos moleculares, de contenidos en azúcares reductores y de osmolalidad para los productos obtenidos (producto C a partir del sustrato A y producto D a partir del sustrato B).

Tabla I

	% de enlaces α -1,6	Mw 10 ³ daltones	% de azúcares reductores	Osmolalidad mOsm/kg
A	5,9	4,88	2	16
C	8,7	1,19	1,5	12
B	5,4	0,9	3,8	25
D	8	0,61	4,3	25

20 El contenido de enlaces glucosídicos α -1,6 es sensiblemente más alto, pero no alcanza todavía los valores deseados.

La sociedad solicitante ha descubierto por lo tanto que debía realizarse un tratamiento complementario, por la acción de enzimas que hidrolizan específicamente los enlaces glucosídicos α -1,4 (como la β -amilasa o la amiloglucosidasa) o por la utilización de enzimas que completan la ramificación de enlaces α -1,6 (como la α -transglucosidasa) de la siguiente manera.

25 Para los tratamientos enzimáticos complementarios, las soluciones de las maltodextrinas ramificadas C y D se llevan en primer lugar a la temperatura y al pH de la enzima elegida.

30 1) Para el tratamiento complementario con α -amilasa (LYSASE 2000 a 2444 UBR/g de extracto enzimático), dichas soluciones de C o de D se llevan a la temperatura de 60°C y al pH de 6,5 a 6,7, y se añaden 6 U de α -amilasa por gramo de sustrato. La incubación se realiza durante 30 minutos, y la reacción es detenida por ebullición 6 minutos.

35 2) Para el tratamiento complementario con β -amilasa (BBA SPEZYME de GENENCOR), dichas soluciones de C o de D se llevan a la temperatura de 40°C y al pH de 4,9 a 5, y se añaden 30 U de β -amilasa por gramo de sustrato. La incubación se realiza durante 2 horas, y la reacción es detenida por ebullición 6 minutos.

40 3) Para el tratamiento complementario con amiloglucosidasa (AMG de SIGMA AA-7420 de *A. Niger*, a 40 U/mg de proteínas), dichas soluciones de C o de D se llevan a la temperatura de 55°C y al pH de 4,7 a 4,9, y se añaden 20 U de la AMG por gramo de sustrato. La incubación se realiza con agitación moderada durante 2 horas, y la reacción es detenida por ebullición 6 minutos.

45 4) Para el tratamiento complementario con α -transglucosidasa (α -TGase L-AMANO, actividad de 27,7 μ moles en glucosa), dichas soluciones de C o de D se llevan a la temperatura de 55°C y al pH de 5 a 5,2, y se añaden 2 U de la α -TGasa por gramo de sustrato.

La incubación se realiza durante 1 hora, y la reacción es detenida por ebullición 6 minutos.

Se determinan a continuación las características fisicoquímicas:

- productos E y F (obtenidos por tratamiento complementario con α -amilasa de los productos respectivamente C y D),
- productos G y H (obtenidos por tratamiento complementario con β -amilasa de los productos respectivamente C y D),
- productos I y J (obtenidos por tratamiento complementario con AMG de los productos respectivamente C y D) y,
- productos K y L (obtenidos por tratamiento complementario con α -TGasa de los productos respectivamente C y D).

10 **Tabla II**

	% de enlaces α -1,6	Mw 10^5 daltones	% de azúcares reductores	Osmolalidad mOsm/kg
E*	8,3	0,72	3,8	29
G	8,4	0,76	22,5	132
I	9	0,49	55	320
K	9,6	1,2	22	153
F*	7,4	0,44	8,7	52
H	7,2	0,51	23,8	141
J	7,8	0,47	50,5	301
L	12	0,69	28	192
*ejemplos comparativos				

La osmolalidad y el contenido de azúcares reductores que aumentan, traducen aquí la producción concomitante principalmente de glucosa, de DP2 (maltosa e isomaltosa), que es por lo tanto necesario eliminar para obtener los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención.

- 15 Se elige utilizar un fraccionamiento por ultrafiltración sobre membrana con un umbral de corte de 5000 daltones (membrana 5K AMICON).

Los resultados obtenidos para los productos de ultrafiltración M, O, Q, S de los compuestos respectivamente E, G, I y K, por una parte, (por lo tanto procedentes de GLUCIDEX® 2), y productos de ultrafiltración N, P, R, T de los compuestos respectivamente F, H, J y L (por lo tanto procedentes de GLUCIDEX® 6) se presentan en la siguiente Tabla III.

20 **Tabla III**

	% de enlaces α -1,6	Mw 10^5 daltones	% de azúcares reductores	Osmolalidad mOsm/kg
M*	10,2	0,89	0,42	1
O	15	0,75	0,3	1
Q	18,8	0,57	0,37	2
S	12,1	1,22	0,33	1
N*	10,9	0,69	0,54	2
P	14,4	0,51	0,8	3
R	18,1	0,55	0,5	5
T	12,2	0,72	0,6	3
*Ejemplos comparativos				

Estos resultados muestran el hecho de que los polímeros de glucosa altamente ramificados así obtenidos presentan el equilibrio perfecto entre proporción de enlaces glucosídicos α -1,6 notablemente elevada (hasta el 18%), para productos que presentan este valor de peso molecular y un valor tan bajo de osmolalidad.

- 5 Estos polímeros de glucosa altamente ramificados se pueden mezclar fácilmente con otros electrolitos para proporcionar agentes osmóticos extremadamente productivos en diálisis peritoneal, o ser utilizados como tales en composiciones destinadas a regular la digestión, para la nutrición parenteral y enteral, para composiciones destinadas a los diabéticos, o también en bebidas líquidas para reconstituir las reservas de energía para deportistas durante un esfuerzo físico de larga duración.
- 10 Hay que resaltar que, además de estos polímeros de glucosa altamente ramificados, el procedimiento permite también reunir las fracciones enriquecidas en maltosa y/o isomaltosa.

Por ejemplo, en el caso de la preparación de los productos S y T (procedentes del tratamiento combinado con la enzima de ramificación y con la α -TGasa), la isomaltosa y la glucosa son los únicos coproductos fabricados (en las concentraciones respectivas de 25 a 30 g/l y 75 a 80 g/l).

- 15 De igual manera, en el caso de la preparación de los productos O y P (procedentes del tratamiento combinado con la enzima de ramificación y la β -amilasa), la maltosa es el único coproducto fabricado (en la concentración de 130 g/l).

Estas fracciones de bajo peso molecular pueden por lo tanto constituir fuentes ventajosas de composiciones ricas en maltosa y/o isomaltosa.

20 Ejemplo 2

Los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención también pueden prepararse a partir de almidón de maíz estándar. Para esto, se vuelve a poner en suspensión 110 g en peso seco de almidón en un litro de agua a temperatura ambiente y con agitación lenta y continua.

- 25 Se lleva el pH de 6,8 a 7, y se deja en estas condiciones durante 15 minutos, rectificando el pH si fuese necesario. Se añade la enzima de ramificación del glicógeno purificada de *B. stearothermophilus* a razón de 4000 U/g de sustrato, elevando progresivamente la temperatura de 72 a 75°C.

- 30 La incubación se efectúa a continuación con agitación moderada durante 30 minutos, y a continuación enfriamiento a una temperatura de 65 a 68°C. La reacción enzimática se lleva a cabo durante 4 horas. La reacción es detenida a continuación por reducción del pH hasta un valor de 4,5 a 5, y a continuación se lleva a ebullición durante 6 minutos.

Como en el ejemplo 1, la reacción se completa mediante tratamientos con β -amilasa o amiloglucosidasa, y mediante una etapa de ultrafiltración sobre membrana de un umbral de corte de 5000 daltones en las condiciones dadas en el ejemplo 1.

- 35 La Tabla IV reúne los resultados obtenidos.

El almidón de maíz estándar es referenciado como U; el producto de tratamiento con enzima de ramificación V, los tratados como complemento con la β -amilasa: W por la AMG: X; los productos finales ultrafiltrados: Y y Z.

Tabla IV

	% de enlaces α -1,6	Mw 10 ⁵ daltones	% de azúcares reductores	Osmolalidad mOsm/kg
U	3,6	110	<0,01	Nd
V	8,8	1,75	0,2	2
W	8,9	1,31	20,5	117
Y	16,3	1,38	0,1	2
X	7,9	0,55	55	357
Z	24,2	0,45	0,4	2

Los productos Y y Z obtenidos presentan los mismos perfiles equilibrados que los descritos en el ejemplo 1 y, por lo tanto, pueden ser ventajosamente aplicados en los mismos campos de aplicación.

Ejemplo 3

5 Otros dos polímeros de glucosa altamente ramificados son preparados a partir de dos variedades de almidón rico en amilopectina, en condiciones industriales. Se trata de dos muestras de almidón de maíz ceroso fluidificado ácido con un nivel de fluidificación WP de aproximadamente 90, comercializadas también por la sociedad solicitante con el nombre de marca CLEARGUM® CB 90.

10 La Tabla V presenta las condiciones operativas aplicadas para conseguir polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención.

Tabla V

Base	CLEARGUM CB90	CLEARGUM CB90
Solubilización	Cocedor continuo labo a 25% MS	Cocedor continuo labo a 25% MS
Primera enzima	Enzima de ramificación 50.000 U/ml-1ml/100 g en peso seco	Enzima de ramificación 50.000 U/ml-1ml/100 g en peso seco
Primer tratamiento enzimático	70°C pH 6,8 22 horas y desactivación 1 hora a 90-95°C	70°C pH 6,8 22 horas y desactivación 1 hora a 90-95°C
Segunda enzima	Amiloglucosidasa OPTIDEX L300A 0,08 ml/100 g en peso seco + 0,08 ml/100 g en peso seco después de 1 hora y 30 minutos	B-amilasa SPEZYME BBA 0,2 ml/100 g en peso seco
Segundo tratamiento enzimático	55°C pH 4,7 – 2 horas y 3 horas y a continuación desactivación 1 hora a 90-95°C	40°C pH 5 – 2 horas y a continuación desactivación 1 hora a 90-95°C
Purificación	Filtración sobre 8, y a continuación 0,22 µm – Ultrafiltración sobre membranas PCI Membrane Systems ES209 (9000Da) – Tratamiento Negro NORIT SX+ 5% c/s pH 5 70°C 1 hora – Ajuste del pH a 5,8 y filtración sobre 8 y a continuación 0,22 µm	Ajuste del pH a 3,5 durante 18 horas – Centrifugación 5000 rpm 10 minutos - Filtración sobre tierra filtrante y a continuación 8 µm – Ultrafiltración sobre membranas PCI Membrane Systems ES209 (9000Da) – Tratamiento Negro NORIT SX+ 5% c/s pH 5 70°C 1 hora – Filtración sobre 8 y a continuación 0,22 µm
Recuperación	Concentración en seco en el rotavapor en vacío	Concentración en seco en el rotavapor en vacío

15 La Tabla VI presenta los resultados obtenidos en términos de contenidos en enlaces glucosídicos α-1,6, de valores de los pesos moleculares, de contenidos en azúcares reductores y de osmolalidad para los productos obtenidos:

- “a” se refiere al producto procedente de CLEARGUM® CB90, después del tratamiento con la enzima de ramificación y la amiloglucosidasa, y
- “b” se refiere al producto procedente de CLEARGUM® CB90, después del tratamiento con la enzima de ramificación y la β-amilasa.

20

Tabla VI

	% de enlaces α -1,6	Mw 10^6 daltones	% de azúcares reductores	Osmolalidad mOsm/kg
"a"	19,4	0,33	1	12
"b"	14,3	0,68	0,7	6

Estos resultados muestran bien que el procedimiento aplicado permite obtener polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención, cualquiera que sea la base almidón o derivado de almidón elegida.

5 Ejemplo 4

Se preparan soluciones acuosas de polímeros altamente ramificados según la invención, que se ponen en contacto con una amilasa de origen pancreático. La hidrólisis amilásica va seguida en el tiempo por la medición de los azúcares reductores formados y por la medición de la glucosa que aparece en el medio de reacción. Este ensayo permite evaluar la resistencia de los polímeros a la hidrólisis amilásica, que es un criterio esencial en la elección de un agente osmótico para solución de diálisis.

Se prueban diversos polímeros según la invención en comparación con la icodextrina (agente osmótico de la técnica anterior). Los polímeros son elegidos para presentar un peso molecular cercano al de esta última.

Los productos A y B como se han preparado según el ejemplo 3 y el producto Z como se ha preparado según el ejemplo 2.

La icodextrina se fabrica según la patente EP 667.356 mencionada en la descripción.

Un testigo maltosa se realiza para validar el modelo *in vitro* de digestión enzimática.

Las condiciones operativas para la digestión amilásica son las siguientes:

- Pesar aproximadamente 0,6 g de producto a ensayar precisamente,
- Añadir 150 ml de tampón maleato de Na pH 7 a 0,1 mol/l,
- Agitar hasta la disolución del producto,
- Tomar 1,5 ml de la solución obtenida (solución inicial = si),
- Colocar los frascos al baño María durante 15 minutos, para que la temperatura de la solución sea de 37°C,
- Añadir 0,15 g de pancreatina de cerdo (α -amilasa de origen animal)
- Incubar a 37°C en baño termostático con agitación durante 300 minutos FTA,
- Realizar tomas de muestras de 1,5 ml en los tiempos, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 minutos,
- Detener la reacción enzimática colocando las muestras en un baño seco a 100°C, durante 10 minutos,
- Dosificar la glucosa sobre las muestras, para simular el impacto sobre la glicemia del producto estudiado,
- Dosificar los azúcares reductores sobre las muestras para estudiar la velocidad de hidrólisis.

Para la dosificación de la glucosa, se utiliza un procedimiento colorimétrico, realizado sobre autómata HITACHI 704 (ROCHE). El reactivo utilizado es un reactivo que contiene las enzimas GOD/PAP (glucosa oxidasa, peroxidasa). El volumen de reactivo utilizado es de 500 microlitros, el volumen de muestra es de 5 microlitros y la temperatura de la reacción es de 30°C.

El procedimiento utilizado para la dosificación de los azúcares reductores es el procedimiento de SOMOGYI NELSON. En un tubo cerrado, se introducen 200 microlitros de muestra, se añaden 200 microlitros de solución de trabajo (reactivos tartrato de sodio y sulfato de cobre). Se lleva a ebullición, se añade después del enfriamiento reactivo arsenomolibdico, y a continuación agua. La solución obtenida se deposita en una microplaca, y a continuación se lee la absorbencia en el lector de microplacas a una longitud de onda de 520 nanómetros.

Los resultados son consignados en las siguientes tablas:

1. Cinética de aparición de la glucosa (en % liberado en seco)

45

ES 2 269 943 T5

Tiempo (en minutos)	MALTOSA	A	B	Z	ICODEXTRINA
SI	0,26	3,35	0,00	0,53	0,28
0	0,26	4,75	0,93	1,19	1,96
15	0,79	5,31	1,59	-	3,07
30	1,06	5,68	1,96	2,11	3,63
45	1,59	5,86	2,24	-	3,91
60	2,12	6,14	2,52	2,37	4,19
90	2,65	6,52	2,89	-	4,75
120	3,44	6,61	3,17	2,90	5,31
180	5,03	7,26	4,76	3,43	6,15
240	6,35	8,10	-	3,96	6,99
300	7,68	8,38	5,41	4,22	7,82

2. Cinética de aparición de los azúcares reductores (en % en seco)

Tiempo (en minutos)	MALTOSA	A	B	Z	ICODEXTRINA
SI	51,01	5,76	0,88	1,45	2,74
0	49,82	18,34	18,04	8,92	31,07
15	47,94	19,33	18,96	-	30,39
30	48,29	20,00	19,04	11,00	32,53
45	48,55	20,25	19,78	-	32,46
60	48,84	19,92	20,80	11,10	32,95
90	49,42	20,37	19,42	-	34,16
120	47,15	21,68	21,04	12,16	34,40
180	48,87	22,46	21,79	12,22	36,64
240	50,90	23,05	23,11	12,29	37,03
300	52,20	22,67	22,88	13,64	37,06

3. Síntesis de los resultados

PRODUCTOS ENSAYADOS	% de glucosa liberada a 300 minutos	% de azúcares reductores formados a 300 minutos	Proporción de enlaces α -1,6 en %	Masa Molar (daltones)
MALTOSA	7,41	52,20	0	342
A	5,03	16,91	19,4	33000

B	5,41	22,88	14,3	68000
Z	3,69	12,19	24,2	45000
ICODEXTRINA	7,54	34,32	6,5-8	12000-20000

Se observa según los resultados obtenidos que cuanto más aumenta la proporción de ramificación (la proporción de enlaces α -1,6) más disminuye la hidrólisis amilásica.

5 Esta última es igualmente dependiente del peso molecular. De este modo, cuanto más elevada es la proporción de ramificación y cuanto más pequeño es el peso molecular, menos atacada resulta la molécula por la amilasa.

Para una utilización en diálisis intraperitoneal, los productos A y Z están particularmente adaptados y presentan una resistencia netamente superior a la icodextrina, lo que significa que estos productos presentan una ventaja cierta en términos de duración del poder osmótico y del poder glicemiante, para un peso molecular similar.

10 Ejemplo 5

15 Se preparan soluciones acuosas de polímeros altamente ramificados según la invención, que se ponen en contacto con una amilasa de origen pancreático y con una amiloglucosidasa intestinal (polvo acetónico de intestino). La hidrólisis va seguida en el tiempo por la medición de la glucosa que aparece en el medio de reacción. Este ensayo permite evaluar la resistencia de los polímeros a la hidrólisis por las enzimas implicadas en la digestión de los

15 glúcidos alimentarios, lo cual es un criterio esencial en la elección de un ingrediente alimentario que entra en la composición de formulaciones de uso para deportistas o destinadas a la nutrición enteral y parenteral.

Diversos polímeros según la invención son ensayados en comparación con la icodextrina, el glicógeno y una maltodextrina estándar. Los polímeros elegidos son los siguientes:

20 Producto A como el preparado según el ejemplo 3, producto Y como el preparado según el ejemplo 2, y producto Y' preparado según el ejemplo 2 a partir de un almidón rico en amilopectina tratado con la enzima de ramificación y ultrafiltrado.

La icodextrina se fabrica según la patente EP 667.356 mencionada en la descripción. El glicógeno es un glicógeno de hígado de buey proporcionado por la sociedad SIGMA-ALDRICH.

Un testigo maltodextrina estándar se realiza para validar el modelo *in vitro* de digestión enzimática.

25 Las condiciones operativas para la digestión enzimática son las siguientes:

Pesar aproximadamente 0,6 g de producto a ensayar precisamente,

Añadir 150 ml de tampón maleato de sodio pH 7 a 0,1 mol/l,

Agitar hasta la disolución del producto,

Tomar 1,5 ml de la solución obtenida,

30 Colocar los frascos al baño María durante 15 minutos, para que la temperatura de la solución sea de 37°C,

Añadir 0,15 g de pancreatina de cerdo,

Incubar a 37°C en baño termorregulado con agitación durante 30 minutos,

Realizar tomas de muestras de 1,5 ml en los tiempos, 0 minutos y 30 minutos,

Detener la reacción enzimática colocando las muestras en un baño seco a 100°C, durante 10 minutos,

35 Añadir 0,15 g de mucosa intestinal de rata,

Incubar durante 5 horas y 30 minutos a 37°C en el baño termorregulado con agitación,

Realizar tomas de muestras de 1,5 ml cada 60 minutos en los tiempos 60, 120, 180, 240, 300, 330 y 360 minutos,

Detener la reacción enzimática colocando las muestras en un baño seco a 100°C durante 10 minutos,

ES 2 269 943 T5

Dosificar la glucosa sobre las muestras, para calcular el porcentaje de hidrólisis del producto estudiado,

Para la dosificación de la glucosa, se utiliza el mismo procedimiento que en el ejemplo 4.

Los resultados son consignados en las siguientes tablas:

1. Cinética de aparición de la glucosa (en % liberado en seco)

	Tiempo (en minutos)	MALTOD. estándar	GLICÓGENO	A	Y	Y'	ICODEXTRINA
Amilasa pancreática	0	0	0	0	0	0	0
	15	0,79	2,87	2,61	2,17	3,90	3,35
	30	1,06	3,30	2,70	2,71	4,74	3,63
Amilasa intestinal	60	20,88	12,62	9,77	13,71	16,31	15,09
	90	38,59	22,81	16,66	23,34	28,29	26,96
	120	52,07	31,41	23,17	32,17	40,28	37,86
	150	62,90	39,45	28,66	39,22	48,64	47,22
	180	70,83	46,04	32,75	44,52	57,84	55,88
	210	78,86	51,50	37,03	49,00	64,53	63,01
	240	83,78	56,09	39,64	52,39	68,71	69,01
	270	88,81	59,96	42,62	54,56	72,33	72,09
	300	91,18	62,40	45,50	57,27	75,96	76,28
	330	93,03	64,26	47,27	58,63	79,44	78,37
	360	94,36	65,84	51,64	60,80	81,11	80,89

5

2. Síntesis de los resultados

PRODUCTOS ENSAYADOS	% de glucosa liberada a 360 minutos	Proporción de enlaces α -1,6 en %	Masa Molar (daltones)
MALTODEXTRINA ESTÁNDAR	94,36	0	3000-5000
GLICÓGENO	65,84	10	10^6 - 10^7
A	51,64	19,4	33000
Y	60,80	16,3	138000
Y'	81,11	7,9	133000
ICODEXTRINA	80,89	6,5-8	12000-20000

Las maltodextrinas según la invención están particularmente adaptadas para una utilización en nutrición para deportistas o, más generalmente, para regular la glicemia. Los productos A e Y según la invención permiten obtener un porcentaje de liberación de glucosa comprendido entre el 50 y el 70%, es decir una resistencia a la hidrólisis netamente superior a las maltodextrinas clásicas y comparable al glicógeno, lo que significa que estos

10

productos presentan una ventaja cierta en términos de poder glicemiante y pueden de este modo constituir ventajosamente un sustituto del glicógeno puesto que presentan características de digestión similar.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que tienen un contenido en azúcares reductores inferior al 1%, **caracterizados porque** presentan:
- una proporción de enlaces glucosídicos α -1,6 comprendidos entre el 12 y el 30%,
 - un peso molecular, determinado mediante difusión de la luz, de un valor comprendido entre $0,3 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^5$ daltones,
 - una osmolalidad, determinada según un ensayo A, de un valor comprendido entre 1 y 15 mOsm/kg, consistiendo el ensayo A en determinar la osmolalidad de una solución que contiene 100 g en peso seco de dichos polímeros de glucosa altamente ramificados colocados en 1 kg de agua, con la ayuda de un osmómetro MARK 3 de FISKE® ASSOCIATES.
- 15 2.- Polímeros según la reivindicación 1, **caracterizados porque** presentan:
- un peso molecular determinado mediante difusión de la luz, de un valor comprendido en $0,5 \cdot 10^5$ y $1,5 \cdot 10^5$ daltones,
 - una osmolalidad, determinada según un ensayo A, al menos igual a 1 e inferior a 2 mOsm/kg.
- 20 3.- Polímeros según la reivindicación 1, **caracterizados porque** presentan:
- un peso molecular, determinado mediante difusión de la luz, de un valor comprendido en $0,5 \cdot 10^5$ y $0,8 \cdot 10^5$ daltones,
 - una osmolalidad, determinada según un ensayo A, al menos igual a 2 e inferior a 5 mOsm/kg.
- 25 4.- Polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según una u otra de las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizados porque** presentan entre el 15 y el 30% de enlaces glucosídicos α -1,6.
- 30 5.- Polímeros según la reivindicación 1, **caracterizados porque** presentan:
- un peso molecular, determinado mediante difusión de la luz, de un valor comprendido en $0,3 \cdot 10^5$ y $0,7 \cdot 10^5$ daltones,
 - una osmolalidad, determinada según un ensayo A, al menos igual a 5 e inferior a 15 mOsm/kg.
- 35 6.- Procedimiento de preparación de los polímeros según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por**:
- preparar una suspensión acuosa de almidón o una solución de derivado de almidón de una materia seca al menos igual al 1% en peso, preferiblemente del 10 al 50% en peso,
 - tratar dicha suspensión o dicha solución con al menos una enzima de ramificación a una temperatura comprendida entre 25°C y 80°C durante un periodo de 1 a 24 horas,
 - hacer actuar sobre la suspensión o sobre la solución así obtenida al menos una enzima elegida en el grupo constituido por la β -amilasa, la amiloglucosidasa y la α -transglucosidasa,
 - efectuar un fraccionamiento con la ayuda de al menos una técnica elegida en el grupo de las separaciones sobre membrana o las cromatografías, para recuperar las fracciones de alto peso molecular, y las de bajo peso molecular,
 - recoger los polímeros de glucosa altamente ramificados correspondientes a las fracciones de alto peso molecular así obtenidas.
- 40 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** la enzima de ramificación se elige en el grupo constituido por las enzimas de ramificación del glicógeno, las enzimas de ramificación del almidón y cualesquiera mezclas de estas enzimas.
- 45 8.- Procedimiento según una u otra de las reivindicaciones 6 y 7, **caracterizado porque** la técnica de fraccionamiento se elige en el grupo constituido por la técnica de separación sobre membrana de ultrafiltración y por la técnica de separación cromatográfica sobre soporte del tipo gel.
- 50 55 60 65

9.- Uso de los polímeros de glucosa altamente ramificados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para preparar composiciones destinadas a ser utilizadas en las industrias particularmente del papel-cartón, textil, cosmética y en particular farmacéutica y alimentaria.

5

10.- Uso según la reivindicación 9, en la cual las composiciones están destinadas a ser utilizadas en los campos de la nutrición enteral y parenteral, como agente inhibidor y regulador de la glicemia, como aporte energético durante actividades físicas y como agente regulador de la digestión.

10 11.- Solución para diálisis peritoneal **caracterizada porque** comprende, como agente osmótico, por lo menos un polímero soluble altamente ramificado según la reivindicación 1.

12.- Solución para diálisis según la reivindicación 11, **caracterizada porque** dicho polímero soluble altamente ramificado presenta:

15

- un peso molecular, determinado mediante difusión de la luz, de un valor comprendido en $0,3 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^5$ daltones,

- una osmolalidad, determinada según un ensayo A, al menos igual a 5 e inferior a 15 mOsm/kg.

20 13.- Solución para diálisis peritoneal según una u otra de las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizada porque** comprende, además, un poliol elegido en el grupo constituido por sorbitol, manitol, maltitol, xilitol, eritritol.

14.- Solución según la reivindicación 13, **caracterizada porque** comprende, además, soluciones tampón como las sales de lactato, de acetato, de gluconato.

25