

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 692**

51 Int. Cl.:
C08B 30/12 (2006.01)
C08B 30/18 (2006.01)
C08B 30/20 (2006.01)
C08B 35/00 (2006.01)
A61M 1/28 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04293056 .0**
96 Fecha de presentación: **20.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1548033**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **POLÍMEROS SOLUBLES DE GLUCOSA ALTAMENTE RAMIFICADOS.**

30 Prioridad:
19.12.2003 FR 0315085

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73 Titular/es:
Roquette Frères
62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:
Fuertes, Patrick;
Roturier, Jean-Michel y
Petitjean, Carole

74 Agente: **Veiga Serrano, Mikel**

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).

ES 2 369 692 T3

DESCRIPCIÓN

Polímeros solubles de glucosa altamente ramificados

5 **Sector de la técnica**

10 La invención tiene como objeto polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que presentan un bajo contenido de azúcares reductores, una tasa de enlaces glucosídicos α -1,6 notablemente elevada, un intervalo estrecho de altos pesos moleculares y un perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas absolutamente particular.

La invención se refiere igualmente a polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que presentan una baja viscosidad intrínseca.

15 La invención destina más particularmente estos polímeros solubles de glucosa altamente ramificados a aplicaciones alimentarias y sobre todo médicas.

20 Se entiende por "perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas" en el sentido de la invención el reparto de tamaños, expresado en grado de polimerización (o GP), de las cadenas glucosídicas lineales α -1,4 ligadas a otras cadenas glucosídicas lineales α -1,4 por puntos de ramificación α -1,6.

La invención se refiere igualmente a un procedimiento de fabricación de dichos polímeros solubles de glucosa altamente ramificados.

25 **Estado de la técnica**

Los polímeros de glucosa industrialmente accesibles se preparan clásicamente mediante la hidrólisis de almidones naturales o híbridos y de sus derivados.

30 Los hidrolizados de almidón estándar son producidos así mediante la hidrólisis ácida o enzimática de almidón de cereales o tubérculos. Son de hecho una mezcla de glucosa y de polímeros de glucosa de pesos moleculares extremadamente variados.

35 Estos hidrolizados de almidón (dextrinas, maltodextrinas, etc.) producidos en la industria (con un cierto GP medio) consisten en una amplia distribución de sacáridos que contienen a la vez estructuras lineales y ramificadas.

Los hidrolizados de almidón, y especialmente las maltodextrinas, se usan más particularmente como transportadores o agentes de carga, agentes texturantes, soportes de atomización, agentes filmógenos, agentes de control de la congelación o agentes anticristalizantes.

40 Pueden usarse igualmente como agentes de reemplazo de materias grasas o por su aporte nutritivo.

45 A nivel intestinal, los hidrolizados de almidón se digieren así por la α -amilasa pancreática, que actúa directamente sobre las cadenas lineales ligadas en α -1,4.

Esta digestión enzimática dirigida conduce a reducir el tamaño de dichos hidrolizados de almidón hasta las dextrinas límite, y entonces un cierto número de enzimas ligadas a la mucosa intestinal (maltasa, sacarasa y α -dextrinasa) siguen hidrolizando los sacáridos lineales y los sacáridos ramificados residuales hasta unidades de glucosa.

50 La cinética de estas diferentes digestiones enzimáticas es entonces directamente una función de la estructura de los hidrolizados de almidón.

55 Por ejemplo, la α -amilasa pancreática va a actuar más fácilmente sobre hidrolizados de almidón ricos en oligosacáridos lineales o que presentan estructuras ramificadas de cadenas largas, mientras que va a actuar más difícilmente o nada en absoluto sobre estructuras ramificadas compactas que presentan mayoritariamente cadenas cortas.

60 En el estado de la técnica, generalmente se emplean estos dos tipos de estructuras diferentemente, en función de los campos de aplicación pretendidos.

El primer tipo de estructuras derivadas del almidón (especialmente aquel de oligosacáridos de GP corto) se usa como fuente de glucosa asimilable directamente por el organismo, especialmente en tres campos de aplicación.

65 El primer campo de aplicación es el de los sustratos energéticos para deportistas.

Efectivamente, en el campo deportivo, una bebida consumida durante una actividad física que requiera mucho esfuerzo debe aportar instantáneamente la energía y el agua necesarios para compensar la pérdida de fluido por la transpiración.

5 Resulta que una composición equilibrada en hidratos de carbono es esencial para obtener dicho resultado.

Una solución propuesta clásicamente para la bebida óptima es preferir oligosacáridos lineales cortos de GP de 3 a 6 a estructuras glucosídicas ramificadas más compactas, puesto que estos oligosacáridos cortos se absorben con frecuencia más elevada manteniendo la osmolalidad a un nivel moderado, impidiendo así la pérdida de fluidos y efectos secundarios tales como diarrea y calambres.

10 El segundo campo de aplicación es el de la alimentación parenteral, donde soluciones nutritivas aportadas por vía venosa son concebidas para mantener a un paciente con buena salud y para proporcionarle nutrientes cuando ya no puede alimentarse por medio de su sistema digestivo normal.

15 Se elige aquí igualmente administrar oligosacáridos lineales con un GP comprendido entre 2 y 5, ya que estos sacáridos se hidrolizan por las maltasas en el riñón, y la glucosa liberada se reabsorbe entonces. Es por ello que el uso de oligosacáridos lineales cortos permite aportar suficiente energía a una solución isotónica sin sobrehidratar al paciente.

20 El tercer campo de aplicación es el de la nutrición entérica, donde es necesario proporcionar bebidas que puedan ingerirse por vía oral o bien administrarse por vía tubular al estómago o al intestino delgado.

25 Para estos fluidos entéricos, el problema principal es sin embargo la diarrea, debido a una osmolalidad demasiado alta.

El segundo tipo de estructuras derivadas del almidón, concretamente aquel de hidrolizados de almidón o de derivados de almidón que presentan estructuras ramificadas compactas de cadenas cortas, se usa para ralentizar la liberación de glucosa asimilable y/o aportar una cierta osmolalidad, especialmente en tres campos de aplicación.

30 El primer campo de aplicación es el del campo de la diálisis peritoneal continua y ambulatoria.

La patente EP 207.676 explica que, para uso en diálisis, se prefieren hidrolizados de almidón que comprendan estructuras ramificadas que forman soluciones transparentes e incoloras al 10% en agua que tienen un peso molecular (Mw) de 5×10^3 a 10^6 Da y un índice de polimolecularidad o Ip bajo a los oligosacáridos lineales de GP corto.

40 Esto se traduce en composiciones que comprenden mayoritariamente polímeros de glucosa de alto peso molecular comprendido entre 5×10^3 y 5×10^5 Da, que no comprenden glucosa ni oligosacáridos de GP inferior o igual a 3, o muy poco, y nada o muy poco de polímeros de glucosa de Mw superior a 10^6 Da.

45 Se comprende en efecto fácilmente para esta aplicación en diálisis peritoneal que los oligosacáridos de GP corto y de bajo peso molecular atraviesan rápidamente la pared peritoneal y por lo tanto no tienen un interés duradero para la creación de un gradiente de presión osmótica, y que los polímeros de muy alto peso molecular, desprovistos de capacidad osmótica, han de evitarse e incluso prohibirse, ya que son potencialmente peligrosos si precipitaran posteriormente a su degradación.

50 En su patente EP 667.356, la compañía solicitante proponía un procedimiento de fabricación, a partir de almidón ceroso, de un hidrolizado de almidón completamente soluble en agua y de bajo índice de polimolecularidad, inferior a 2,8, que tiene un Mw comprendido entre 5×10^3 y 1×10^6 Da.

55 Este procedimiento consistía en hidrolizar por vía ácida una lechada de almidón constituida exclusivamente por amilopectina y entonces completar esta hidrólisis ácida mediante una hidrólisis enzimática con la ayuda de α -amilasa bacteriana, y someter a cromatografía el hidrolizado obtenido sobre resinas catiónicas muy macroporosas en forma alcalina o alcalinotérrica.

60 Ha de observarse que, en ese momento, la compañía solicitante recomendaba usar solo almidones casi exclusivamente compuestos por amilopectina y habitualmente denominados almidones cerosos como materia prima en dicho procedimiento, no conviniendo los almidones o féculas que contienen una proporción no despreciable de amilosa.

El segundo campo de aplicación es el de la regulación de la digestión o de la alimentación de diabéticos.

65 Se ha propuesto efectivamente en la patente US 4.840.807 o en la solicitud de patente JP 2001/11101 (n.º de registro 11/187.708) extraer solo las zonas ricas 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.

Se han desarrollado así dos familias de productos. La primera se refiere a dextrinas límite preparadas mediante la degradación de las zonas de enlaces α -1,4 por una α -amilasa sola, y la segunda familia se refiere a las dextrinas preparadas mediante la degradación de las zonas de enlaces α -1,4 mediante la acción simultánea de una α -amilasa y una β -amilasa.

Estas dextrinas límite obtenidas son entonces particularmente resistentes a las enzimas digestivas humanas.

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

El tercer campo de aplicación es el de los sustitutos de plasma sanguíneo.

La solicitud de patente internacional WO 03/18639 recomienda efectivamente desarrollar, únicamente a partir de amilopectina, compuestos hiperramificados para usarlos en el tratamiento quirúrgico o terapéutico de mamíferos o en procedimientos de diagnóstico.

Según las enseñanzas de esta solicitud de patente, y más particularmente en el campo de los sustitutos de plasma sanguíneo, estas amilopectinas hiperramificadas se presentan como las que van a permitir resolver el inconveniente principal de los primeros sustitutos de plasma sanguíneo elaborados, se trata de hidroxietilalmidones o HEA, concretamente su metabolización imperfecta en el organismo.

En esta solicitud de patente, se alude a la estabilidad relativa de dichas amilopectinas hiperramificadas con relación a su contenido elevado de enlaces α -1,6.

Este contenido elevado de enlaces α -1,6 permitiría entonces reducir suficientemente la degradación de amilopectina por la α -amilasa y producir un polisacárido degradable pero que siguiera poseyendo las propiedades de un sustituto del plasma sanguíneo ideal, a saber, sus propiedades farmacocinéticas y su efecto volúmico.

Por otra parte, se prevé igualmente en esta solicitud de patente WO 03/018639 la posibilidad de hacer variar el reparto de los puntos de ramificación para controlar la cinética de degradación de la amilopectina hiperramificada en la dirección deseada.

Sin embargo, la preparación de estas amilopectinas hiperramificadas tiene todavía un inconveniente importante.

Efectivamente, a causa de un grado de ramificación demasiado elevado (hasta un 25% de enlaces α -1,6) o de una distancia demasiado corta entre los puntos de ramificación, el efecto obtenido es diametralmente opuesto al deseado, pues el ataque por la α -amilasa de estas amilopectinas hiperramificadas puede retardarse mucho o no ocurrir en absoluto.

El impedimento estérico es tal que, en las regiones de la molécula en que la densidad de los puntos de ramificación es elevada, el acceso de la α -amilasa ya no es posible.

En estas condiciones, la ausencia de digestibilidad enzimática de estas amilopectinas hiperramificadas no favorece particularmente el uso de dichas estructuras como sustitutos de plasma sanguíneo (acumulación de productos no degradados).

Por todo lo precedente, resulta que existe por tanto una necesidad insatisfecha de disponer de polímeros de glucosa altamente ramificados que presenten propiedades estructurales notables en términos de reparto de las longitudes de cadenas ramificadas y de viscosidad intrínseca, y que confieran por consiguiente a los productos que los contienen mayores capacidades de duración y de digestibilidad controlada.

Estas propiedades permitirían entonces el uso de estos polímeros de glucosa altamente ramificados en campos de aplicación tan variados como el aporte de sustratos energéticos en actividades físicas y en los campos de la diálisis peritoneal, nutrición entérica o parenteral, sustitutos de plasma sanguíneo, y regulación de la digestión y alimentación de diabéticos.

La compañía solicitante ha tenido el mérito de compaginar todos estos objetivos considerados hasta ahora difícilmente compaginables imaginando y elaborando, a costa de numerosas investigaciones, nuevos polímeros solubles de glucosa altamente ramificados absolutamente particulares en lo referente a su distribución de las longitudes de las cadenas ramificadas y su viscosidad intrínseca.

Objeto de la invención

Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención son polímeros de glucosa que

presentan un contenido de azúcares reductores inferior a un 1%, una tasa de enlaces glucosídicos α -1,6 comprendida entre 13 y 17% y un Mw de un valor comprendido entre $0,9 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^5$ Da, caracterizados por el hecho de que su perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas está constituido por de 70 a 85% de GP inferior a 15, de 10 a 16% de GP comprendido entre 15 y 25 y de 8 a 13% de GP superior a 25.

Preferiblemente, los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención presentan un coeficiente de viscosidad intrínseca "a" según la relación de MARK-HOUWINK-SAKURADA inferior o igual a 0,1.

La compañía solicitante ya ha descrito en su solicitud de patente EP 1.369.432 polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que tienen un contenido de azúcares reductores inferior a un 1%, una tasa de enlaces α -1,6 comprendida entre 12 y 30% y un Mw de un valor comprendido entre $0,35$ y 2×10^5 Da.

Sin embargo, ninguno de los polímeros de glucosa descritos y ejemplificados en dicha solicitud de patente presenta el perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas ni la viscosidad intrínseca de los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención, como se ejemplificará a continuación.

La determinación de la capacidad reductora, de la tasa de enlaces glucosídicos α -1,6 y de las masas moleculares de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención se realiza en las mismas condiciones que las descritas en la solicitud de patente EP 1.369.432.

Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención presentan entonces un contenido de azúcares reductores inferior a un 1%, una tasa de enlaces glucosídicos α -1,6 comprendida entre 13 y 17% y un Mw de un valor comprendido entre $0,9 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^5$ Da.

Con relación a los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados de la solicitud de patente EP 1.369.432 de la compañía solicitante, los nuevos polímeros de glucosa según la invención presentan espectros más estrechos de tasas de enlaces glucosídicos α -1,6 y de peso molecular.

Pero los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención se caracterizan sobre todo por su perfil de distribución de las longitudes de cadenas.

Descripción detallada de la invención

La determinación de la longitud de las cadenas ramificadas de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención se realiza en dos etapas.

Una primera etapa consiste en desramificar dichos productos (hidrólisis específica del enlace α -1,6) con la ayuda de una isoamilasa bacteriana, seguido de una segunda etapa de identificación del grado de polimerización de los oligosacáridos liberados por cromatografía de exclusión estérica (HPSEC) en comparación con pululanos de tamaño conocido.

Esta técnica consiste en pesar 50 mg de productos para analizar y añadir 3,75 ml de agua. Después de la agitación de esta mezcla, se añaden 0,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se lleva a ebullición con agitación durante 30 minutos. Se baja a continuación la temperatura a 45 °C y se añaden 0,25 ml de solución tampón de acetato de sodio 1 M (previamente llevada a pH 3,5 con ácido acético).

Se añaden a continuación 10 μ l de una isoamilasa extraída de *Pseudomonas amyloclavata* comercializada por la compañía HAYASHIBARA (a razón de 59.000 U/mg) y se deja actuar a 45 °C durante 1 hora. Se procede a realizar este tratamiento enzimático dos veces sucesivas, y entonces se detiene la reacción por ebullición durante 3 minutos.

Después de la adición de 0,5 ml de n-butanol, la agitación y la conservación a temperatura ambiente sin agitación durante 1 hora, se centrifuga a continuación el medio de reacción a 2600 rpm durante 20 minutos y se desmineraliza el sobrenadante con la ayuda de resinas Amberlite 200 y Amberlite IRA-67, comercializadas respectivamente por las compañías FLUKA y SIGMA.

Se realizan una última agitación y filtración sobre filtro de nailon de 0,45 μ m de porosidad antes de inyectar en una columna de HPSEC.

Se parametriza la cromatografía HPSEC de la forma siguiente (en columna PWXL oligo comercializada por TSK y en columnas SB802 + 803 + 804 + 805 comercializadas por Shodex):

- Volumen de inyección: 200 μ l.

- Caudal: 0,5 ml/min.

- Temperatura de las columnas: 40 °C.
- Eluyente: nitrato de sodio 0,2 M + 0,02% de azida de sodio.

5 - Duración de la elución: 180 min.

Se determina el tamaño de los oligosacáridos liberados mediante su tiempo de elución con relación al tiempo de elución de pululanos de tamaño conocido.

10 Los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención presentan entonces un perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas constituido por:

- de 70 a 85% de GP inferior a 15,

15 - de 10 a 16% de GP comprendido entre 15 y 25,

- de 8 a 13% de GP superior a 25.

20 Este perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas conduce a obtener estructuras notables por su contenido elevado de cadenas ramificadas cortas (70 a 85% de GP inferior a 15) y su contenido aún relativamente alto de cadenas ramificadas de tamaño medio a largo (15 a 30% de GP superior a 15).

25 Por ello, los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención son ricos en cadenas de GP mayoritariamente corto (más de un 70% de GP inferior a 15), lo que permite obtener una estructura ramificada compacta mayoritariamente de cadenas cortas y que comprende sin embargo suficientes cadenas de tamaño medio a largo (hasta un 30%) que las α -amilasas pancreáticas pueden digerir fácilmente para liberar glucosa asimilable por el organismo.

30 Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención se caracterizan igualmente por el valor de su coeficiente de viscosidad intrínseca "a" según la relación de MARK-HOUWINK-SAKURADA.

35 La medida del coeficiente de viscosidad intrínseca "a" según la relación de MARK-HOUWINK-SAKURADA se usa por la compañía solicitante para ilustrar el grado de compacidad de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención.

Es conocido por el especialista en la materia que la relación empírica de MARK-HOUWINK-SAKURADA que liga la viscosidad intrínseca (η) de un polímero con su masa molecular media viscosimétrica (o M_v) está dada por la ecuación siguiente:

$$40 \quad \eta = K \times (M_v)^a$$

en la que "K" y "a" son constantes que dependen de la naturaleza del polímero estudiado, de la naturaleza del disolvente y de la temperatura.

45 En las condiciones de análisis según la invención, el disolvente usado por la compañía solicitante es una solución acuosa de nitrato 0,2 M.

La constante "a" está ligada más particularmente al volumen hidrodinámico medio ocupado por el polímero en el disolvente considerado.

50 Se ha establecido en el estado de la técnica que, para un polímero en solución, cuanto más replegada está la molécula sobre sí misma, menor es el valor de "a". A la inversa, para una molécula "muy desplegada", el valor de "a" es más elevado.

55 La medida del coeficiente "a" según la relación de MARK-HOUWINK-SAKURADA se determina mediante el cálculo con la ayuda de la ecuación siguiente:

$$\log \eta = \log K + a \log (M_v)$$

60 Se representa la curva de $\log \eta$ en función del $\log (M_v)$, cuya ordenada en el origen proporciona el $\log K$ y la pendiente de la derecha es el coeficiente "a".

Se determinan los valores de viscosidad y de masa molecular media viscosimétrica de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención en un viscosímetro capilar Viscotek (modelo 250) acoplado con un refractómetro R410, después de la separación en columnas Shodex SB 802 + 803 + 805.

65

Las condiciones operativas cromatográficas son las siguientes:

- 5 - Inyección: 100 µl.
- Caudal: 0,5 ml/min.
- Temperatura de las columnas: 35 °C.
- 10 - Eluyente: Nitrato de sodio 0,2 M y 0,02% de azida de sodio.
- Tiempo de análisis: 180 min.

Las condiciones operativas para la detección refractométrica son:

- 15 - Sensibilidad de R410: 16 X.
- Temperatura del viscosímetro: 35 °C.

- 20 El marcador de caudal es una solución de glicerina al 5% en el eluyente.

Se realiza la calibración del detector con la ayuda de un poli(óxido de etileno) comercializado por la compañía VISCOTEK de peso molecular, concentración y viscosidad intrínseca conocidos.

- 25 La recuperación de esta referencia permite calcular la "masa constante" y la "viscosidad constante" del viscosímetro.

La recuperación del pico de elución del marcador de caudal permite el cálculo del tiempo de referencia y de los volúmenes interdetectores.

- 30 Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención presentan entonces un coeficiente "a" calculado según la relación de MARK-HOUWINK-SAKURADA inferior a 0,1, lo que se traduce en un estado de compacidad elevado, muy superior a la amilopectina (la amilopectina estándar, en las mismas condiciones de medida, presenta efectivamente un valor del coeficiente "a" de 0,33).

- 35 Los polímeros de glucosa altamente ramificados obtenidos así están por tanto particularmente bien adaptados a su uso en los campos de aplicación en los que es necesario disponer de estructuras compactas y densas, por ejemplo, en diálisis peritoneal o en alimentación para diabéticos.

- 40 La determinación de la resistencia de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención a las enzimas implicadas en la digestión de glúcidos alimentarios es igualmente un criterio esencial en la elección de un ingrediente alimentario que entre en la composición de formulaciones de uso para deportistas o destinadas, por ejemplo, a la nutrición entérica o parenteral.

- 45 La compañía solicitante había estimado el porcentaje de liberación de glucosa mediante digestión enzimática de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados descritos en su solicitud de patente EP 1.369.432 en un valor comprendido entre 50 y 70%.

Esta resistencia a la hidrólisis es netamente superior a la de las maltodextrinas clásicas y comparable a la del glucógeno.

- 50 Como se ejemplificará a continuación, los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención liberan al final glucosa en proporciones similares a las descritas en dicha patente EP 1.369.432, lo que los sigue haciendo aptos para usarse por los deportistas o para nutriciones entérica y parenteral, pero esta liberación de glucosa se efectúa de forma bastante más retardada en el tiempo, lo que las destina ventajosamente a campos de aplicación que requieren regular la glucemia, como la alimentación de diabéticos.

No existen, que sepa la compañía solicitante, polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que posean dicha distribución de sus longitudes de cadenas ramificadas que permita emplearlos en todos los campos de aplicación pretendidos por la presente invención.

- 60 Ventajosamente, los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención pueden clasificarse en tres subfamilias.

- 65 Estas tres subfamilias presentan un perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas que difiere en su contenido de cadenas medias, de GP comprendido entre 15 y 25.

La primera subfamilia cubre los polímeros altamente ramificados que presentan al menos un 14% y como máximo un 16% de GP comprendido entre 15 y 25.

5 La segunda subfamilia cubre los polímeros altamente ramificados que presentan al menos un 12% y como máximo un 14% de GP comprendido entre 15 y 25.

La tercera subfamilia cubre los polímeros altamente ramificados que presentan al menos un 10% y como máximo un 12% de GP comprendido entre 15 y 25.

10 Esta variabilidad en el reparto de cadenas de tamaño medio permite el uso ventajoso de estas subfamilias en aplicaciones alimentarias o médicas en las que es necesario hacer variar la digestibilidad de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados usados.

15 Estas tres subfamilias presentan efectivamente las tres una estructura ramificada constituida por cadenas de tamaño mayoritariamente corto, pero cuyas proporciones variables de cadenas medias permiten no solo modular el grado de compacidad, sino igualmente controlar la liberación de glucosa, como se ejemplificará a continuación.

20 Para preparar los polímeros solubles de glucosa ramificados según la invención, se realiza la sucesión de etapas siguiente, que consiste en:

1) preparar una solución acuosa de almidón que presenta un contenido de amilosa de al menos un 30% en peso, preferiblemente comprendido entre 35 y 80% en peso,

25 2) tratar sucesivamente dicha solución con una enzima de ramificación y entonces una β -amilasa,

3) efectuar un fraccionamiento de manera que se recuperen las fracciones de alto peso molecular,

4) recoger los polímeros de glucosa altamente ramificados así obtenidos.

30 La preparación de los polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención se realiza modificando las condiciones operativas ya descritas en la solicitud de patente EP 1.269.432 de la compañía solicitante.

35 En primer lugar, al contrario de lo que se describe en la solicitud de patente EP 1.269.432, la elección de una calidad de almidón particular reviste una gran importancia.

La compañía solicitante ha encontrado efectivamente que solo los almidones cuyo contenido en amilosa supera el 30% pueden servir como materia prima en el procedimiento de la invención.

40 Las maltodextrinas, los almidones estándares (que no comprenden más de un 30% de amilosa) o los almidones de tipo ceroso, cualquiera que sea su origen botánico, no convienen en absoluto para la fabricación de polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención.

45 Por otro lado, es mérito de la compañía solicitante haber vencido un prejuicio técnico que dice que para la obtención de una estructura ramificada estable, compacta y que presente una digestibilidad controlada, hay que partir de almidones ricos en amilopectina (como expone la solicitud de patente WO 03/018639).

50 Como se ejemplificará a continuación, la compañía solicitante ha encontrado que, al contrario, es con la elección de almidones ricos en amilosa usados como sustratos de partida como es posible obtener polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención.

Es igualmente con la elección del contenido de amilosa de los almidones usados como sustratos de partida como es posible obtener las tres subfamilias definidas anteriormente.

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

60 En la solicitud de patente EP 1.369.432, la compañía solicitante recomendaba usar de 50.000 a 500.000 U de enzima de ramificación purificada por 100 g de almidón o de derivado de almidón seco, a una temperatura comprendida entre 25 y 95 °C, preferiblemente a una temperatura comprendida entre 70 y 95 °C, durante un periodo de 18 a 24 horas.

Se entiende por enzimas de ramificación las enzimas de ramificación elegidas del grupo constituido por las enzimas de ramificación de glucógeno, las enzimas de ramificación de almidón y cualquier mezcla de estas enzimas.

65 Para la obtención de nuevos polímeros de glucosa altamente ramificados según la invención, la compañía solicitante recomienda tratar preferiblemente la solución de almidón rica en amilosa con de 40.000 a 150.000 U de enzima de

ramificación por 100 g de almidón, a una temperatura comprendida entre 25 y 80 °C durante un periodo de 7 a 24 horas, preferiblemente entre 18 y 24 horas.

La tercera etapa del procedimiento según la invención consiste en hacer actuar una β -amilasa sobre la solución de almidón así tratada.

Las condiciones de acción (temperatura y pH) de esta enzima son hacer actuar de 0,05 a 0,5 ml de β -amilasa de tipo Spezyme BBA de GENENCOR (a 1500 DP°/ml) por 100 g de almidón a una temperatura de 60 °C, un pH de 4,9 a 5, durante 1-3 horas, preferiblemente durante 2 horas.

La unidad "DP°" significa "grados de poder diastásico", concretamente, la cantidad de enzima contenida en 0,1 ml de una solución al 5% de la preparación de enzima que produciría una cantidad de azúcares reductores suficiente para reducir 5 ml de licor de Fehling cuando la muestra se incubaba con 100 ml de sustrato durante 1 hora a 20 °C.

Al contrario de lo que se describe en la solicitud de patente EP 1.369.432, no se usa por tanto una enzima arbitraria elegida del grupo constituido por α -amilasa, β -amilasa, amiloglucosidasa y α -transglucosidasa, sino que se emplea preferiblemente la β -amilasa.

La compañía solicitante ha encontrado efectivamente que era mediante la elección de esta enzima particular como era posible obtener fácilmente polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención.

Al final de este tratamiento complementario, los polímeros de glucosa altamente ramificados solubles se obtienen en mezcla con sus productos de degradación enzimática, mayoritariamente constituidos por glucosa y maltosa.

La cuarta etapa del procedimiento consiste en efectuar un fraccionamiento con la ayuda de una técnica elegida del grupo de separaciones por membrana y cromatografías, de manera que se recuperen las fracciones de alto peso molecular y las fracciones de bajo peso molecular, como se describe en la solicitud de patente EP 1.369.432 de la compañía solicitante.

Cualquiera que sea el procedimiento empleado, los perfiles obtenidos permiten la separación de la fracción polisacáridica de alto peso molecular correspondiente a los polímeros de glucosa altamente ramificados solubles según la invención, de las fracciones oligosacáridicas de bajo peso molecular constituidas esencialmente por glucosa y maltosa.

La última etapa del procedimiento según la invención consiste por tanto en recoger las fracciones de alto peso molecular correspondientes a los polímeros de glucosa altamente ramificados.

Los productos de alto peso molecular pueden reunirse como tales, precipitarse con etanol, purificarse y secarse al vacío durante 24 horas o incluso atomizarse mediante cualquier técnica conocida por el especialista en la materia.

Como se ejemplificará a continuación, la compañía solicitante ha encontrado por último que, para hacer variar el contenido de cadenas medias ramificadas (GP comprendido entre 15 y 25) de los polímeros solubles de glucosa ramificados según la invención, hay que variar el contenido de amilosa del almidón.

Efectivamente, cuanto más elevado sea el contenido de amilosa del almidón usado como sustrato de partida, menor será el contenido de cadenas ramificadas de GP comprendido entre 15 y 25 de los productos obtenidos.

Se elige preferiblemente un almidón cuyo contenido de amilosa esté comprendido entre al menos un 30% y como máximo un 40% para obtener la primera familia de polímeros según la invención, que presentan al menos un 14% y como máximo un 16% de GP comprendido entre 15 y 25. Los almidones de guisante estándares convienen particularmente para la obtención de esta primera familia.

Se elige preferiblemente un almidón cuyo contenido de amilosa esté comprendido entre al menos un 40% y como máximo un 60% para obtener la segunda familia de polímeros según la invención, que presentan al menos un 12% y como máximo un 14% de GP comprendido entre 15 y 25.

Se elige por último un almidón cuyo contenido de amilosa esté comprendido entre al menos un 60% y como máximo un 80% para obtener la segunda familia de polímeros según la invención, que presentan al menos un 10% y como máximo un 12% de GP comprendido entre 15 y 25.

Las características fisicoquímicas particulares de los polímeros según la invención los destinan ventajosamente a aplicaciones alimentarias y médicas, y más particularmente aún, como aporte de sustratos energéticos en actividades físicas y en los campos de la diálisis peritoneal, la nutrición entérica o parenteral, los sustitutos de plasma sanguíneo y la regulación de la digestión y la alimentación en diabéticos.

Aparecerán otras características y ventajas de la invención con la lectura de los ejemplos no limitantes descritos a

continuación.

Ejemplo 1

- 5 Se prepara una solución de almidón al 10% de materia seca a partir de un almidón de guisante que presenta una riqueza de almidón superior a un 95% y un contenido de amilosa de un 36,7%.

Para esto, se ponen en suspensión 100 g de almidón de guisante seco en 1 l de agua a temperatura ambiente y con agitación.

- 10 Se realiza la solubilización total del almidón en una caldera a 145 °C durante 3-4 minutos y entonces se enfría a 70 °C. Se añade continuamente la enzima de ramificación de glucógeno purificada de *Bacillus stearothermophilus* a razón de 1 ml de solución de enzima a 50.000 U/ml por 100 g de sustrato seco.

- 15 Se lleva la reacción enzimática durante 21 horas a 70 °C y a pH 6,8 y se detiene entonces por calentamiento a 90 °C durante 1 h.

- 20 El tratamiento complementario con 0,15 ml de β -amilasa (BBA Spezyme de GENENCOR a 1500 DP°/ml) por 100 g de almidón seco se efectúa en el medio de reacción precedente llevado a una temperatura de 60 °C y un pH de 4,9 a 5.

Se realiza la incubación durante 2 horas, y se detiene la reacción por calentamiento durante 1 h a 90 °C.

- 25 Se ultrafiltra a continuación el medio de reacción por membrana con un umbral de corte de 9000 Da (membrana ES209 de PCI), y se recoge y atomiza el ultrafiltrado.

La tabla I siguiente presenta los resultados de las características fisicoquímicas (tasa de enlaces α -1,6, Mw y contenido de azúcares reductores) del polímero soluble de glucosa ramificado según la invención así obtenido.

30 Tabla I

Tasa de enlaces α -1,6 (%)	14
Mw (10^5 Da)	0,96
Contenido de azúcares reductores (%)	0,14

- 35 Se determina el porcentaje de azúcares reductores siguiendo el procedimiento de Somogyi, descrito por N. Nelson en "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose", 1944, *J. Biol. Chem.*, 153, pág. 375-380.

Se determina entonces el perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas como se indica anteriormente.

- 40 La tabla II siguiente presenta los resultados obtenidos.

Tabla II

GP 2 a GP 15 (%)	71,7
GP 15 a GP 25 (%)	15,4
GP > 25 (%)	12,9

- 45 El polímero soluble de glucosa ramificado obtenido presenta una distribución notable de sus longitudes de cadenas ramificadas que se traduce en un poco más de un 70% de cadenas cortas (GP inferior a 15) y un poco menos de un 30% de cadenas medias a largas (GP superior a 15).

- 50 El valor del parámetro "a" de MARK-HOUWINK-SAKURADA, determinado mediante la metodología descrita anteriormente, es de 0,1.

El polímero soluble de glucosa ramificado según la invención presenta por tanto una estructura compacta replegada sobre sí misma, sin embargo con cadenas aún accesibles a los ataques enzimáticos.

55

Ejemplo 2

Se realiza un estudio comparativo de los perfiles de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas de los productos de la reacción por enzima de ramificación y β -amilasa sobre sustratos que comprenden contenidos variables de amilosa.

Se tratan entonces de la misma forma que se describe en el ejemplo 1, almidón de maíz ceroso (almidón A), almidón de maíz estándar (almidón B) y dos variedades de almidón rico en amilosa que comprenden respectivamente un 50 y un 70% de almidón (almidones D y E). Figuran igualmente en esta tabla los resultados obtenidos con almidón de guisante (almidón C) obtenidos en el ejemplo 1.

La tabla III siguiente presenta las cantidades de enzimas de ramificación (incubación de 18 a 21 horas) y de β -amilasa (tratamiento de 2 horas) usadas para el tratamiento de las diferentes variedades de almidón.

Tabla III

Almidones de partida	A	B	C	D	E
Enzima de ramificación (ml por 100 g)	1	1	1	1,5	2
Spezyme BBA (%)	0,05	0,1	0,15	0,13	0,1

La tabla IV presenta los resultados obtenidos en términos de tasa de ramificación α -1,6, pesos moleculares y contenidos de azúcares reductores de los polímeros de glucosa altamente ramificados así preparados.

Los compuestos se identifican como productos F, G, H, I y J, obtenidos respectivamente a partir de los almidones A, B, C, D y E. Se recuperan las características del producto H del ejemplo 1.

Tabla IV

Productos de la reacción	F	G	H	I	J
Tasa de enlaces α -1,6 (%)	11,2	13,3	14	15,2	13,1
Mw (10^5 Da)	0,84	0,77	0,96	0,96	1,31
Contenido de azúcares reductores (%)	0,2	0,015	0,14	0,39	0,29

Los tratamientos enzimáticos sobre los tres sustratos ricos en amilosa (contenidos respectivos de amilosa de 37,5, 50 y 70%) permiten fabricar polímeros solubles de glucosa ramificados que presentan una tasa de ramificación α -1,6 en el intervalo estrecho de 13 a 15%, para un peso molecular comprendido entre 0,9 y $1,5 \times 10^5$ Da.

El tratamiento del almidón de maíz ceroso y del almidón de maíz estándar, descrito por otra parte en la solicitud de patente EP 1.369.432, conduce a polímeros de glucosa ramificados que presentan una tasa de enlaces α -1,6 en el intervalo de 11 a 13% y un valor de peso molecular comprendido en el intervalo de 0,7 a $0,9 \times 10^5$ Da.

El uso de almidones ricos en amilosa como sustrato de partida permite por tanto, de forma notable, obtener polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que presentan tasas de enlaces glucosídicos α -1,6 y pesos moleculares más elevados que los obtenidos a partir de sustratos más ricos en amilopectina, lo que es en sí notable.

La tabla V siguiente reúne los diferentes perfiles de distribución de las longitudes de cadenas de los diferentes productos obtenidos. Figuran igualmente los valores del coeficiente de viscosidad intrínseca "a" según MARK-HOUWINK-SAKURADA.

Tabla V

	F	G	H	I	J
GP 2 a GP 15	63,8	71,9	71,7	78,3	80,4
GP 15 a GP 25	21,8	16,3	15,4	12,6	11,5
GP >25	14,4	11,8	12,9	9,1	8,1
Coeficiente de viscosidad intrínseca "a"	0,12	0,12	0,1	0,08	0,09

Se confirma que los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados obtenidos a partir de almidones ricos en

amilosa presentan de 70 a 85% de cadenas cortas, de 10 a 16% de cadenas medias y de 8 a 13% de cadenas largas.

Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados obtenidos a partir de almidones ricos en amilopectina contienen menos de un 72% de cadenas cortas, más de un 16% de cadenas medias y entre 11 y 15% de cadenas largas.

Se confirma igualmente que cuanto mayor es el contenido de amilosa de los almidones tratados, menor será la proporción componente de cadenas de tamaño medio que presentan los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados obtenidos.

Los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención presentan por tanto sobre todo un contenido de cadenas medias inferior a un 16%, y preferiblemente comprendido entre 10 y 16% (lo que no es el caso de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados preparados a partir de almidón de maíz estándar y almidón ceroso).

Las medidas del coeficiente de viscosidad intrínseca "a" según MARK-HOUWINK-SAKURADA traducen igualmente la diferencia en el grado de compacidad de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados obtenidos.

Se confirma que solo los almidones ricos en amilosa permiten obtener polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que presentan un valor de coeficiente de viscosidad intrínseca inferior o igual a 0,1.

Por otra parte, se confirma igualmente que es posible hacer variar el grado de compacidad de los polímeros solubles de glucosa ramificados según la invención haciendo variar el contenido de amilosa de los almidones usados como sustratos de las reacciones enzimáticas.

En consecuencia, las estructuras más compactas se obtienen de hecho a partir de los almidones más ricos en amilosa.

Ejemplo 3

Para determinar el grado de liberación de glucosa, se preparan soluciones acuosas de polímeros solubles de glucosa 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 es seguida en el tiempo por la medida de la glucosa que aparece a lo largo del tiempo 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 glúcidos alimentarios.

Se ensayan dos polímeros según la invención (los productos H e I del ejemplo 2) en comparación con los polímeros de glucosa obtenidos a partir de almidón estándar (el producto G del ejemplo 2) cuyo análisis se ha realizado en la solicitud de patente EP 1.369.432 de la compañía solicitante, en comparación con glucógeno.

Las condiciones operativas para la digestión enzimática son las siguientes:

Se pesan con precisión 0,6 g del producto a ensayar.

Se añaden 150 ml de tampón de maleato de sodio 0,1 mol/l a pH 7 y se agita hasta la disolución del producto.

Se dispone la solución obtenida al baño María durante 15 minutos, para que la temperatura de la solución sea de 37 °C.

Se toman 1,5 ml de la solución, se añaden 0,15 g de pancreatina de cerdo y se incuba durante 30 min.

Se detiene la reacción enzimática disponiendo las muestras en un baño seco a 100 °C durante 10 minutos.

Se añaden 0,75 g de pancreatina de cerdo y se incuba durante 3 h 30 min a 37 °C en baño termostatzado y con agitación.

Se toman muestras regularmente a lo largo de la hidrólisis enzimática.

Se valora entonces la glucosa de las muestras para calcular el porcentaje de hidrólisis del producto estudiado.

Se realiza esta valoración con la ayuda de un procedimiento colorimétrico en un autómata HITACHI 704 (ROCHE).

El reactivo usado es un reactivo que contiene las enzimas glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD/PAP). El volumen de reactivo usado es de 500 μ l, el volumen de muestra es de 5 μ l y la temperatura de la reacción es de 30 °C.

Se presentan los resultados en la tabla VI siguiente.

5

Tabla VI

Glucosa liberada:	Producto G	Producto H	Producto I
Entre 30 y 60 minutos (% del seco)	36,52	27,77	29,91
Entre 60 y 120 min (% del seco)	27,59	35,27	27,57

10 Se confirma que, a entre 30 y 60 minutos de la reacción, los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención (productos H e I) preparados respectivamente a partir del almidón estándar de guisante y almidón que contiene un 50% de amilosa, liberan menos rápidamente su glucosa que el polímero de glucosa (producto G) preparado a partir del almidón de maíz estándar.

15 Sin embargo, este fenómeno se invierte a entre 60 y 120 minutos, liberando el producto H más glucosa que el producto G.

20 Parece claro que los dos polímeros solubles de glucosa altamente ramificados H e I según la invención, preparados a partir de almidón rico en amilosa, pueden emplearse muy bien en la nutrición para deportistas (liberando el producto H después de dos horas de digestión un 63% de glucosa con un efecto retardado), pero igualmente en aplicaciones en que es necesario regular la glucemia (liberando el producto I a lo largo del tiempo una cantidad menor de glucosa que los demás productos).

25 Se confirma que la elección del contenido de amilosa del almidón de partida condiciona el uso de los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la invención en campos de aplicación bien definidos.

REIVINDICACIONES

1. Polímeros solubles de glucosa altamente ramificados que presentan un contenido de azúcares reductores inferior a un 1%, una tasa de enlaces glucosídicos α -1,6 comprendida entre 13 y 17% y un Mw de un valor comprendido entre $0,9 \times 10^5$ y $1,5 \times 10^5$ Da, caracterizados porque el hecho de que su perfil de distribución de las longitudes de cadenas ramificadas está constituido por de 70 a 85% de GP inferior a 15, de 10 a 16% de GP comprendido entre 15 y 25 y de 8 a 13% de GP superior a 25.
2. Polímeros según la reivindicación 1, caracterizados porque el hecho de que presentan un coeficiente de viscosidad intrínseca "a" según la relación de MARK-HOUWINK-SAKURADA inferior o igual a 0,1.
3. Polímeros según una u otra de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizados porque el hecho de que presentan entre al menos un 14% y como máximo un 16% de GP comprendido entre 15 y 25.
4. Polímeros según una u otra de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizados porque el hecho de que presentan entre al menos un 12% y como máximo un 14% de GP comprendido entre 15 y 25.
5. Polímeros según una u otra de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizados porque el hecho de que presentan entre al menos un 10% y como máximo un 12% de GP comprendido entre 15 y 25.
6. Procedimiento de preparación de polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el hecho de que:
 - 1) se prepara una solución acuosa de almidón que presenta un contenido de amilosa de al menos un 30% en peso, preferiblemente comprendido entre 35 y 80% en peso,
 - 2) se trata sucesivamente dicha solución con una enzima de ramificación y entonces una β -amilasa,
 - 3) se efectúa un fraccionamiento de manera que se recuperen las fracciones de alto peso molecular,
 - 4) se recogen los polímeros de glucosa altamente ramificados así obtenidos.
7. Procedimiento de preparación de polímeros solubles de glucosa altamente ramificados según la reivindicación 6, caracterizado porque el hecho de que se trata la solución acuosa de almidón:
 - con de 40.000 a 150.000 U de enzima de ramificación por 100 g de almidón a una temperatura comprendida entre 25 y 80 °C durante un periodo de 7 a 24 horas, preferiblemente entre 18 y 24 horas,
 - y entonces con 0,05% a 0,5 ml de β -amilasa por 100 g de almidón, a una temperatura de 60 °C y un pH de 4,9 a 5, durante un periodo comprendido entre 1 y 3 horas, preferiblemente durante 2 horas.
8. Procedimiento según una u otra de las reivindicaciones 6 y 7, susceptible de producir los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados de la reivindicación 3, caracterizado porque la solución acuosa de almidón presenta entre al menos un 30% y como máximo un 40% en peso de amilosa, y es preferiblemente almidón de guisante estándar.
9. Procedimiento según una u otra de las reivindicaciones 6 y 7, susceptible de producir los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados de la reivindicación 4, caracterizado porque la solución acuosa de almidón presenta entre al menos un 40% y como máximo un 60% en peso de amilosa.
10. Procedimiento según una u otra de las reivindicaciones 6 y 7, susceptible de producir los polímeros solubles de glucosa altamente ramificados de la reivindicación 5, caracterizado porque la solución acuosa de almidón presenta entre al menos un 60% y como máximo un 80% en peso de amilosa estándar.
11. Uso de los polímeros de glucosa altamente ramificados según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o susceptibles de obtenerse mediante el procedimiento de las reivindicaciones 6 a 10 en aplicaciones alimentarias y médicas.
12. Uso según la reivindicación 11 como aporte de sustratos energéticos en actividades físicas y en los campos de la diálisis peritoneal, la nutrición entérica o parenteral, los sustitutos de plasma sanguíneo y la regulación de la digestión y alimentación de diabéticos.