

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 377 015**

(51) Int. Cl.:  
**A61P 3/10** (2006.01)  
**A61K 38/38** (2006.01)  
**A61K 35/20** (2006.01)  
**A23L 1/305** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Número de solicitud europea: **07731348 .4**  
(96) Fecha de presentación: **24.04.2007**  
(97) Número de publicación de la solicitud: **2029231**  
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

(54)

Título: **Utilización de la alfa-lactoalbúmina para la regulación de la glucemia**

(30)

Prioridad:  
**27.04.2006 FR 0603810**

(73)

Titular/es:  
**Compagnie Laitiere Europeenne**  
**50890 Conde-sur-Vire, FR**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.03.2012**

(72)

Inventor/es:  
**TOME, Daniel;**  
**HUNEAU, Jean-François;**  
**MIKOGAMI, Takashi y**  
**LAPLAIZE, Benoît**

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.03.2012**

(74)

Agente/Representante:  
**Aznárez Urbieto, Pablo**

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 2 377 015 T3**

**DESCRIPCIÓN**

Utilización de la alfa-lactoalbúmina para la regulación de la glucemia

La invención tiene por objeto la utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina para prevenir la intolerancia a la glucosa y/o para prevenir o tratar la aparición de una resistencia a la insulina. A tal efecto, la  $\alpha$ -lactoalbúmina puede utilizarse en una composición destinada a ser absorbida vía enteral o parenteral, ya sea una composición de tipo alimentario, dietético o farmacéutico.

5 La insulinorresistencia se define como una reducción de la respuesta biológica a la acción de la insulina y se traduce en una menor eficacia de la insulina sobre sus tejidos diana.

Su origen es multifactorial y muy complejo, entrando en juego simultáneamente factores ambientales y factores endógenos de origen genético (Pessin J. y Saltiel A.R., 2000, J. Clin. Invest, 106, 165-169).

10 A corto plazo, la insulinorresistencia conlleva un desequilibrio del metabolismo energético, que se manifiesta por el fenómeno de hiperglucemia postprandial. A largo plazo, la diabetes de tipo II es la principal consecuencia de la insulinorresistencia.

15 La diabetes de tipo II se caracteriza por una hiperglucemia crónica en ayunas y una hiperglucemia transitoria anormalmente elevada tras la ingesta de una carga glucídica. Esta escasa regulación de la glicemia se traduce en una débil reacción de los tejidos que aseguran la captación y el metabolismo de la glucosa a la señal de la insulina (resistencia a la insulina). La hiperglucemia es el origen de numerosas complicaciones asociadas a la diabetes, tanto a nivel microvascular como macrovascular.

20 En realidad, la disminución de la capacidad de regular la glucemia es un fenómeno progresivo y la etapa de disminución de la sensibilidad a la insulina es una etapa prepatológica significativa de un riesgo importante de desarrollo de diabetes. La naturaleza alimentaria interviene en la aparición de una menor sensibilidad a la insulina, pero la influencia de la cantidad y de la naturaleza de las proteínas alimenticias no ha sido suficientemente investigada.

25 La acción favorable de las proteínas de pescado, en particular de las proteínas de bacalao fresco, en la regulación de la glucemia, en la mejora de la tolerancia a la glucosa, en la prevención de la resistencia a la insulina, ha sido demostrada en los trabajos de C. Lavigne y col., Am. J. Physiol. Endocrin. Metab. 281: E62-E71, 2001; F. Tremblay y col., Diabetes, 52: 29-37, 2003; C. Lavigne y col., Am. J. Physiol. Endocrin. Metab. 278: E491-E500, 2000.

Las proteínas de pescado demuestran ser más eficaces que las proteínas de soja y que la caseína, aunque su composición de aminoácidos sea relativamente próxima. Sin embargo, el uso de proteínas de pescado en una composición alimenticia dietética o farmacéutica como aditivo destinado a mejorar la absorción celular de la glucosa y/o la regulación de la glucemia presenta diversos inconvenientes.

30 La industria del fraccionamiento de las proteínas de pescado se encuentra actualmente en un nivel de desarrollo poco avanzado, en particular en comparación con la industria de la soja o de la leche. La extracción de estas proteínas a partir de la carne de pescado haría perder a esta última lo esencial de su valor comercial, lo que llevaría a costes prohibitivos.

35 Un objetivo de la presente invención consiste en encontrar un producto que posea propiedades reguladoras de la glucemia y de mejora de la sensibilidad a la insulina. Se ha buscado un producto que sea al mismo tiempo fácil de preparar, económico, fácilmente utilizable como aditivo alimentario, sin perjudicar las cualidades gustativas y/o olfativas del alimento al que se incorpora.

40 También se describe aquí la utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina en composiciones alimenticias o para la preparación de composiciones farmacéuticas como agente regulador de la glucemia, para favorecer la absorción celular de la glucosa y prevenir la aparición de diabetes de tipo II. La  $\alpha$ -lactoalbúmina es una proteína de la leche. Es la segunda proteína principal presente en el suero de la leche o lactosuero, por su porcentaje en peso, después de la lactoferrina o la  $\beta$ -lactoglobulina respectivamente de la leche humana o la bovina.

45 Del documento WO 02/064090 se conoce un complemento alimenticio que contiene proteínas de suero lácteo enriquecidas en  $\alpha$ -lactoalbúmina, azúcares de bajo índice glucémico, materias grasas, cafeína y una fuente de 5-hidroxitriptófano. Este complemento alimenticio va destinado a personas en estados de estrés. Permite aumentar el índice de serotonina en un individuo. Los azúcares de bajo índice glucémico permiten una liberación retardada de glucosa y de la insulina. La  $\alpha$ -lactoalbúmina favorece el aumento de la serotonina proporcionando triptófano, que es un precursor de la serotonina.

50 También del documento EP 1 228 707 se conoce la utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina o de concentrados proteicos de suero de leche enriquecidos con  $\alpha$ -lactoalbúmina como alimentos prebióticos o complementos o aditivos alimenticios. La utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina está destinada a reforzar la población microbiana intestinal, favoreciendo su crecimiento. Estos complementos alimenticios pueden ser utilizados para el tratamiento de la gastroenteritis.

El documento US 6.156.738 describe el uso de complementos alimenticios en forma de barritas que comprenden azúcares simples, proteínas, lípidos y azúcares complejos. Estos complementos alimenticios permiten regular la

hipoglucemia nocturna en diabéticos insulinodependientes. El suero lácteo y la lactoalbúmina se mencionan entre las proteínas a utilizar. El mecanismo de funcionamiento propuesto por los autores es el siguiente: los azúcares se liberan en 3 fases durante la noche: liberación rápida de azúcares simples, liberación de azúcares a partir de las proteínas transformadas por el hígado, liberación de azúcares lentos. En este documento, el término general lactoalbúmina se emplea para designar las proteínas (totales) del lactosuero y no la  $\alpha$ -lactoalbúmina.

Además, en estos complementos alimenticios las proteínas se utilizan como fuente de azúcares y no como reguladoras de la asimilación de glucosa procedente de otra fuente. Por consiguiente, este documento no menciona ni sugiere la utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina para favorecer la asimilación de la glucosa y/o para regular la glucemia y/o para prevenir la aparición de diabetes de tipo II y/o para prevenir la resistencia a la insulina.

10 El documento FR 2 875 680 describe una composición dietética destinada a combatir el síndrome metabólico. Esta composición tiene acción adelgazante y combate el síndrome metabólico del sobrepeso. Este síndrome es susceptible de desembocar en una diabetes de tipo II.

La composición comprende:

- una mezcla de proteínas seleccionadas entre lactosuero,  $\alpha$ -lactoalbúmina, huevo;
- aminoácidos: TRP, HIS, GLN, ARG, Taurina;
- minerales: Ca, Zn, Cr;
- vitaminas B6, B9, C, E,  $\beta$ -caroteno.

Se observa que sólo se aborda la acción adelgazante para las proteínas.

20 También se cita la  $\alpha$ -lactoalbúmina por su papel potencial como agente anticancerígeno (G.H. Mc Intosh y col., Int. Dairy Journal, 5: 425-434, 1998), como aditivo alimenticio que permite prevenir la oxidación de los lípidos y para favorecer la reducción de los tejidos adiposos (J-C. J. Boutheugourd y col., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 283: E565-E572, 202). Del artículo "Les propriétés des protéines de petit lait", Nutranews, 01/11/03, disponible en <http://www.nutranews.org/fra>, se sabe que las caseínas y las proteínas lactoséricas inhiben el sistema renina-angiotensina-aldosterona y, como tal, tendrían la capacidad de disminuir la grasa corporal, así como enfermedades asociadas como la diabetes de tipo II (G.H. Gossens y col., Obesity Reviews, 4: 43, 2003). Sin embargo, este documento no menciona una capacidad particular de la  $\alpha$ -lactoalbúmina para prevenir o tratar la resistencia a la insulina y/o la diabetes de tipo II.

30 Finalmente, el glutatión es capaz de modular el estrés oxidativo y una hipótesis habitualmente propuesta al respecto es atribuir los efectos deletérios de un escaso control glucémico al papel oxidante de la glucosa (A. Ceriello y col., Diabetes Care, 25: 1439, 2002). Además, ciertos estudios demostraron que el glutatión puede modular la tolerancia a la glucosa o la sensibilidad a la insulina (G. Paolisso y col., Am. J. Physiol. 263: E435, 1992; M. Khamaisi y col., Biochem J., 349:579, 2000). Por consiguiente, debido a que el contenido en cisteína de la dieta influye en el aspecto agudo y crónico del contenido en glutatión del organismo (L.C. Lands y col., J. Appl. Physiol. 87: 1381, 1999; M.H. Stipanuk y col., J. Nutr. 132: 3369, 2002), es posible formular la hipótesis de que la  $\alpha$ -lactoalbúmina, por su contenido único en cisteína, era susceptible de limitar el estrés oxidativo y favorecer la sensibilidad a la insulina y, por tanto, podía detener la progresión prepatológica de la intolerancia a la glucosa. Sin embargo, los ensayos descritos en la parte experimental demuestran que el contenido único en cisteína de la  $\alpha$ -lactoalbúmina no basta para explicar la acción de esta proteína en la regulación de la glucemia y la tolerancia a la glucosa.

35 La invención tiene por objeto la utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina para prevenir la intolerancia a la glucosa y/o para prevenir o tratar la aparición de resistencia a la insulina.

40 En particular, la invención tiene por objeto la utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina para la preparación de un medicamento destinado a prevenir la intolerancia a la glucosa y/o para prevenir o tratar la aparición de resistencia a la insulina.

La invención tiene también por objeto el uso de  $\alpha$ -lactoalbúmina para la preparación de una composición alimenticia, eventualmente de una composición dietética, destinada a prevenir la intolerancia a la glucosa y/o para prevenir o tratar la aparición de resistencia a la insulina.

45 La invención tiene asimismo por objeto un proceso de preparación de una composición alimenticia, eventualmente dietética y/o farmacéutica, destinada a prevenir la intolerancia a la glucosa y/o para prevenir o tratar la aparición de resistencia a la insulina, incluyendo el proceso al menos una etapa consistente en introducir  $\alpha$ -lactoalbúmina en una composición alimenticia, eventualmente dietética, o en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 En efecto, tal como se demuestra más adelante en la parte experimental, la  $\alpha$ -lactoalbúmina permite controlar la hiperglucemia posterior a la absorción celular de glucosa. Permite asimismo prevenir la aparición del fenómeno de

resistencia a la insulina. Estas propiedades tienen como consecuencia un efecto beneficioso en la prevención de la diabetes de tipo II y en la aparición de sus síntomas asociados.

Esta propiedad se observa para la  $\alpha$ -lactoalbúmina de una forma mucho más marcada que para las proteínas totales de la leche.

5 La  $\alpha$ -lactoalbúmina es la segunda proteína en porcentaje en peso del lactosuero. La  $\alpha$ -lactoalbúmina bovina es una proteína de 14,2 kD que contiene 123 aminoácidos.

La  $\alpha$ -lactoalbúmina a utilizar en la presente invención puede proceder de leche humana, de vaca, cabra, oveja, yegua, búfala o de cualquier otro mamífero.

10 Se puede utilizar  $\alpha$ -lactoalbúmina bovina purificada: este producto se puede preparar de acuerdo con diferentes procesos conocidos por el especialista en la técnica, tales como el descrito en la EP-1 017 286. La Compañía ARLA FOODS, bajo la marca LAC PRODAN alpha 80®, o la Compañía DAVISCO, bajo la marca BioPURE-Alphalactalbumin®, distribuye comercialmente la misma.

15 Se puede prever también la utilización de una mezcla de proteínas enriquecida con  $\alpha$ -lactoalbúmina, por ejemplo un lactosuero enriquecido con al menos un 30% en peso de  $\alpha$ -lactoalbúmina, con respecto al peso total de proteínas, preferentemente al menos un 40% y especialmente al menos un 50% en peso de  $\alpha$ -lactoalbúmina, tal como está presente en VITALMOR  $\alpha$ -607®, comercializado por la Compañía ARMOR PROTEINES.

20 Se describe también la utilización de un hidrolizado de  $\alpha$ -lactoalbúmina. Por hidrolizado de  $\alpha$ -lactoalbúmina se entiende un hidrolizado parcial o total de  $\alpha$ -lactoalbúmina. Por tanto, puede tratarse de una mezcla de péptidos y/o de aminoácidos procedentes de la hidrólisis de la  $\alpha$ -lactoalbúmina. Esta hidrólisis puede llevarse a cabo por vía química o mediante digestión enzimática.

Las proteínas y las mezclas proteicas a utilizar de acuerdo con la presente invención se emplean ventajosamente en las siguientes condiciones:

En especial, la invención se refiere a la prevención y/o el tratamiento de las patologías mencionadas anteriormente en el ser humano.

25 Ya se trate de un complemento alimenticio, eventualmente dietético, o de una composición farmacéutica, la dosis diaria de  $\alpha$ -lactoalbúmina oscila entre 2 y 100 gramos. Esta dosis se adapta en función del peso y de la edad del individuo y su morfotipo, según si está relacionado con una predisposición a la diabetes de tipo II. Para un individuo adulto de altura y peso medio, se prevé un consumo diario de 10 a 80 g, preferentemente de 20 a 70 g, especialmente de 30 a 50 g de  $\alpha$ -lactoalbúmina, esto es de entre el 10 y el 80% en peso del consumo diario total de proteínas para este individuo, preferentemente del 20 al 70%, especialmente entre el 30 y el 50%.

30 La  $\alpha$ -lactoalbúmina se emplea en las siguientes condiciones:

35 Se puede incorporar a una composición alimenticia, eventualmente dietética, en particular a una composición láctea o en productos derivados lácteos, por ejemplo añadiendo la  $\alpha$ -lactoalbúmina a la base láctea de esta composición y procediendo a la preparación de la composición alimenticia siguiendo un proceso habitual. Por ejemplo, se puede incorporar la  $\alpha$ -lactoalbúmina a la leche y utilizar esta mezcla para preparar yogures, quesos, natillas, leche concentrada y cualquier otro alimento lácteo, tal como especialidades de queso para untar, polvo instantáneo a diluir en leche o agua, dulces, chocolate, helados, bebidas lácteas.

40 Las composiciones dietéticas pueden encontrarse en forma de alimentos preparados, tales como polvos a diluir en agua o leche, cremas dulces o saladas, sopas. En general, las composiciones son de alto contenido proteico (al menos el 50% en peso de proteínas con relación al peso total de la composición) y de bajo contenido en materias grasas y/o azúcares. Vienen acondicionadas en forma de raciones. Se les puede incorporar una cantidad adecuada de  $\alpha$ -lactoalbúmina en sustitución o completando otros constituyentes proteicos, según la indicación y el tipo de dieta en cuestión.

45 Las composiciones dietéticas pueden encontrarse también en forma de cápsulas, comprimidos, polvos, siropes concentrados en  $\alpha$ -lactoalbúmina, eventualmente en asociación con un excipiente apropiado tal como gelatina, lactosa, etc.

50 Las composiciones farmacéuticas también pueden tener forma de polvos, cápsulas, comprimidos, jarabes. Al igual que los complementos dietéticos, pueden incluir otros constituyentes tales como otras proteínas, vitaminas y excipientes farmacéuticamente aceptables. Pueden encontrarse también, según una variante de la invención, en una forma que permita su administración vía rectal, sublingual, subcutánea, intradérmica. Estas composiciones dietéticas o

farmacéuticas, que no se incorporan directamente a la alimentación pero que se consumen en forma de dosis unitarias, se administrarán preferentemente a la hora de las comidas, ventajosamente en un plazo que abarca desde una hora antes de la comida hasta un cuarto de hora después. Preferentemente entre media hora antes de la comida y hasta la comida misma. Ventajosamente, estos complementos se consumen durante la comida misma o durante el cuarto de hora anterior.

5

## PARTE EXPERIMENTAL

Figuras:

- Figura 1: Tolerancia oral a la glucosa, comparación de dietas normo e hiperproteicas;
- 10 Figura 2: Glucemia postprandial después de una primera comida experimental;
- Figura 3: Insulinemia postprandial después de una primera comida experimental;
- Figura 4: Evaluación de la relación glutatión sanguíneo/glutatión total;
- Figura 5: Evaluación de las proteínas carboniladas plasmáticas;
- Figura 6: Glucemia postprandial en la fase de inhibición de la síntesis del glutatión;
- 15 Figura 7: Prueba de tolerancia a la glucosa después de 5 semanas de régimen con sacarosa;
- Figura 8: Medida de la insulina después de 5 semanas de dieta con sacarosa;
- Figura 9: Medida del glutatión sanguíneo en ayunas después de 3 semanas de dieta con sacarosa;
- Figura 10: Medida de las proteínas IRS fosforiladas después de una dieta con sacarosa.

**Ejemplo 1: Comparaciones entre dietas normo e hiperproteicas**

- 20 Se realizaron experimentos con tres grupos de 8 ratas machos de la cepa Wistar Hannover, que recibieron o bien una dieta estándar (normoproteica, incluyendo un 14% de energía de proteínas totales de la leche, denominada "NP"), o bien una dieta hiperproteica estándar (incluyendo un 55% de energía de proteínas totales de la leche, denominada "HPC"), o una dieta hiperproteica de ensayo (un 55% de enregía, incluyendo un concentrado de proteínas séricas enriquecido con  $\alpha$ -lactoalbúmina YV9705 preparado por la Compañía ARMOR PROTEINES, denominada "HPL").
- 25 Las composiciones de los distintos alimentos (NP, HPC y HPL) se presentan en la tabla siguiente en g/kg de alimento:

	NP	HPC	HPL
Proteínas totales de la leche	140	530	0
YV9705	0	0	530
Sacarosa	100,3	46,5	46,5
Almidón de maíz	622,4	286,2	286,2
Compuesto vitamínico AIN 93 VX	10	10	10
Compuesto mineral AIN 93M	35	35	35
Aceite de soja	40	40	40
Celulosa	50	50	50
Bitartrato de colina	2,3	2,3	2,3

En la tabla siguiente se muestran las composiciones proteicas de distintas fracciones proteicas:

	Proteínas totales de la leche	YV9705
Caseína	80%	0%
$\beta$ -lactoglobulina	11%	15%

$\alpha$ -lactoalbúmina	4%	60%
Albúmina sérica	1%	20%
Otras	4%	5%

Tras 8 semanas de dieta, se sacrifican las ratas, se extraen muestras de sangre y de distintos tejidos (hígado, tejido adiposo blanco subcutáneo, tejido adiposo blanco visceral, tejido adiposo marrón, riñón, suprarrenal, mucosa intestinal). En la tabla siguiente se muestran las composiciones corporales medias de las ratas de los distintos grupos.

	Grupo NP	Grupo HPC	Grupo HPL	Efecto dieta (p)*	Efecto dieta*con CA covariable
Peso vivo	359,86±18,9 <sup>a</sup> 10,58±1,45 <sup>a</sup>	346,7±20,8 <sup>ab</sup>	330±17,38 <sup>b</sup>	P<0,05	NS
Hígado	9,94±0,76 <sup>a</sup>	10,24±0,93 <sup>a</sup>	6,21±1 <sup>b</sup>	NS	NS
TA epididimario	8,58±1,38 <sup>a</sup>	7,63±1,36 <sup>ab</sup>	5,49±0,79 <sup>c</sup>	P<0,05	NS
TA perirrenal	11,03±3,2 <sup>a</sup>	8,2±1,17 <sup>b</sup>	6,15±0,67 <sup>b</sup>	P<0,0001	NS
TA subcutáneo	9,27±2,4 <sup>a</sup>	7,88±1,66 <sup>ab</sup>	6,15±0,67 <sup>b</sup>	P<0,05	NS
TA blanco total					NS
TA marrón	28,89±6,62 <sup>a</sup>	23,71±3,41 <sup>a</sup>	17,84±1,68 <sup>b</sup>	P<0,05	
Osamenta	0,77±0,13 <sup>a</sup>	0,66±0,16 <sup>ab</sup>	0,49±0,13 <sup>b</sup>	P<0,05	NS
	10,58±1,45 <sup>a</sup>	9,94±0,76 <sup>a</sup>	10,24±0,94 <sup>a</sup>	NS	NS

\*Promedios ± desviación-típos

TA: tejido adiposo; CA: consumo alimentario

Evaluado mediante prueba F de Fisher, según un modelo mixto.

Los promedios que no comparten un mismo índice son notablemente diferentes (comparaciones obtenidas por contrastes en el modelo mixto).

5

La ganancia de peso de las ratas en ocho semanas es inferior en las ratas sometidas a dieta HPL. Este resultado proviene principalmente de una reducción del 35% del desarrollo de tejido adiposo blanco en las ratas HPL, manteniéndose igual el peso de los demás tejidos. Siendo más débil el consumo energético medio de las ratas con dieta hiperproteica, parte de los resultados sobre la composición corporal podría explicarse por un menor consumo en la dieta hiperproteica. Sin embargo, este grupo HPL tiene un consumo energético equivalente al del grupo HPC, mientras que los efectos de la dieta sobre la composición corporal son más marcados, lo que sugiere que la naturaleza de la proteína (proteínas séricas enriquecidas con  $\alpha$ -lacotalbúmina frente a proteína total de leche) influye en la composición corporal en la dieta hiperproteica.

10

Las pruebas de tolerancia oral a la glucosa demuestran que, sólo después de 4 semanas de dieta, las ratas HPL tienen mucha mayor capacidad de limitar los eventos hiperglucémicos tras la ingesta de una carga de glucosa (Figura 1).

15

Para comparar de forma resumida la tolerancia a la glucosa, se calculan las áreas bajo la curva de glucemia para cada uno de los grupos los días 0 y 27. La tabla siguiente muestra estos resultados, así como los de los análisis estadísticos. Si para el conjunto de los 3 grupos no se observa ninguna deriva de la tolerancia a la glucosa entre el día 0 y el día 27 (efecto edad no significativo), se observa una interacción régimen x edad significativa, con una reducción significativa 20 del área bajo la curva el día 27 en el grupo HPL, por tanto una mejor tolerancia a la glucosa con relación al grupo NP.

Estos resultados indican que parece posible, interviniendo en la calidad y la cantidad de las proteínas mediante la dieta, influir en la tolerancia a la glucosa así como en la composición corporal y limitar la aparición de fenómenos prepatológicos asociados a la diabetes de tipo II.

	NP	HPC	HPL	Interacción régimen x edad (p)*
Día 0	26,5±1:10,5 <sup>a</sup>	24,1±8,1 <sup>a</sup>	32,2±8,4 <sup>a</sup>	
Día 27	30,5±8,9 <sup>a</sup>	22,5±10,5 <sup>ab</sup>	17,9±8,8 <sup>b</sup>	0,03
Efecto edad*	P = 0,15			
Promedios ± desviación-típos (g.min.L-1).				

\*Evaluado mediante prueba F de Fisher según un modelo mixto.

Los promedios que no comparten un mismo índice son notablemente diferentes (comparaciones obtenidas por medio de contrastes en el modelo mixto).

### Ejemplo 2: Resultados obtenidos con dietas normoproteicas en un contexto de inducción nutricional de intolerancia a la glucosa

#### Metodología

- 5 Contexto alimentario/fisiológico: se utiliza una dieta modelo con un 14% de la energía procedente de proteínas donde los glucidos son aportados sólo en forma de sacarosa. Esta dieta induce intolerancia a la glucosa progresivamente en unas semanas en ratas sedentarias. Esta dieta constituye un buen modelo alimenticio/ ambiental para ensayar la influencia de la naturaleza de las proteínas de la dieta.
- 10 Evaluación fisiológica: En vez de pruebas orales de tolerancia a la glucosa, el modelo permite seguir los eventos hiperglucémicos en situación postprandial (después de una comida calibrada). Este modelo se acerca a una situación real alimentaria en el ser humano. La realidad de los eventos glucémicos después de una comida es un criterio pertinente que permite determinar la gravedad del estímulo alimenticio o, por el contrario, la capacidad preventiva de la dieta en estado agudo o crónico (Gavin, J.R., 3rd, Int. J. Clin. Pract. Suppl. 107:14, 1999). Los ensayos se realizan a la instauración de la dieta (agudo) y después de 2 y 4 semanas.
- 15 En paralelo, estas pruebas permiten también determinar, en fase postprandial, la evolución de la insulinenia, de las concentraciones plasmáticas de aminoácidos así como seguir el estado del glutatión en sangre con el fin de relacionar este último con los eventos glucémicos postprandiales. Finalmente, se siguen otros parámetros, tales como el estado antioxidante global (dosificación de la capacidad de absorción de radicales libres) y los daños generados por estrés oxidativo (peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas).

#### 20 Técnicas y planificación

Cuatro grupos de 10 ratas machos de la cepa Wistar Hannover son intervenidos tras su recepción para colocárseles un catéter venoso. Este catéter se introduce a través de la yugular izquierda, baja al nivel de la vena cava y su parte proximal se empalma al nivel craneal, donde se sujetta en su lugar para poder tomar muestras de sangre, en la cantidad deseada, en el animal despierto.

- 25 Una semana después, se dividen las ratas en 4 grupos sometidos a una dieta rica en sacarosa, al 14% de energía proteica, siendo diferente según la naturaleza de las proteínas o la cantidad de cisteína añadida a la dieta:

- Dieta 0 (C0: control) - P14 proteínas totales de la leche;
- Dieta 1 - P14 Alphalac (concentrado de proteínas séricas enriquecido con  $\alpha$ -lactoalbúmina YV9705 de la Compañía ARMOR PROTEINES: aporta aproximadamente 4,6 veces más de cisteína que la dieta de control);
- Dieta 2 - P14 proteínas totales de la leche + cisteína (en forma de N-acetilcisteína) añadida para un contenido total equivalente a la de la Dieta 1 (C1);
- Dieta 3 - P14 proteínas totales de la leche + cisteína (en forma de N-acetilcisteína) añadida para un contenido 13,4 veces más que la dieta de control (C2).

- 35 Las composiciones de los distintos alimentos (C0, Alphalac, C1 y C2) se presentan en la tabla siguiente, en g/kg de alimento.

(mg de materia seca en 3 g de alimento)	C0	Alphalac	C1	C2
Proteínas totales de la leche	420,0		417,6	411,8

YV9705		420,0		
Sacarosa	2168,1	2168,1	2155,6	2125,6
N-acetilcisteína	0	0	17,3	58,8
Compuesto vitamínico AIN 93 VX	30,0	30,0	29,8	29,4
Compuesto mineral AIN 93M	105,0	105,0	104,4	102,9
Aceite de soja	120,0	120,0	119,3	117,6
Celulosa	150,0	150,0	149,1	147,1
Bitartrato de colina	6,9	6,9	6,9	6,8
Contenido en cisteína	3,6	16,5	16,5	48,1

La dieta nº 2 permite apreciar el papel de la cisteína en comparación con la dieta nº 1. La dieta nº 3 permite precisar en cual de los dosis-efectos se sitúa.

5 Las ratas se acostumbran a recibir una parte de su dieta en forma de una comida calibrada que se debe consumir en un tiempo reducido.

Las muestras de sangre en la fase postprandial se extienden sobre ~3 horas, incluyendo este período: seis dosificaciones de glucemia, tres dosificaciones de glutatión (entre las cuales están la forma reducida y la forma oxidada), cuatro dosificaciones de insulinemia.

10 Después de 5 semanas de dieta, las ratas se sacrifican y se mide el glutatión en sangre y en distintos órganos (hígado, músculos, corazón). La actividad y expresión de la  $\gamma$ -glutamil-cisteína-ligasa, enzima clave de la síntesis del glutatión, se miden a nivel hepático.

#### Resultados:

15 La prueba postprandial realizada en el estado agudo, después de la primera ingesta de comida experimental, confirma la hipótesis del efecto beneficioso de un aporte adicional de cisteína sobre la regulación de la glucemia. En efecto, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia postprandial de los animales que han consumido comidas ricas en cisteína son notablemente más bajas que las de los animales de control (Figuras 2 y 3).

Con un aporte de cisteína igual, el efecto del Alphalac sobre la glucemia es más importante que en la dieta C1, lo que sugiere que la cisteína incorporada en las proteínas de  $\alpha$ -lactoalbúmina mejora de forma más eficaz la regulación de la glucemia.

20 Después de 4 semanas de dieta, el nivel de estrés oxidativo en los animales que consumían más cisteína, evaluado mediante las concentraciones sanguíneas y hepáticas de glutatión así como de las proteínas carboniladas plasmáticas, era inferior al de los animales de control (Figura 4 y 5).

De nuevo, con un aporte de cisteína igual, el efecto del Alphalac sobre el estrés oxidativo es más importante que el de la dieta C1, lo que sugiere que la cisteína incorporada en las proteínas de  $\alpha$ -lactoalbúmina mejora de forma más eficaz el nivel antioxidante.

#### Ejemplo 3: Estudio del papel del glutatión neosintetizado en la mejora de la tolerancia oral a la glucosa en respuesta a la cisteína

Para confirmar el papel del glutatión en la regulación de la glucemia así como el interés de la  $\alpha$ -lactoalbúmina como fuente de cisteína con el fin de sintetizar este compuesto, se utiliza un modelo de ratas depletadas en glutatión, 30 inhibiendo la síntesis de este compuesto mediante tratamiento con butionina-sulfoximina. En estos animales se mide la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, así como distintos parámetros ligados al estado de estrés oxidativo. La repleción de los stocks de glutatión y la evolución de la regulación de la glicemia se midieron en respuesta a dietas con distintos niveles de enriquecimiento en  $\alpha$ -lactoalbúmina y de suplementación con cisteína.

#### Metodología

35 Se repitió la metodología del Ejemplo 2, limitándose a la parte aguda del estudio. Cuatro grupos de 10 ratas machos de la cepa Wistar Hannover fueron intervenidos, tras su recepción, para la colocación de un catéter venoso. Este catéter se introduce por la yugular izquierda, baja al nivel de la vena cava y su parte proximal se empalma al nivel craneal, donde se sujetó en su lugar para poder tomar muestras de sangre, en la cantidad deseada, en el animal despierto.

Una semana después, se dividen las ratas en 4 grupos sometidos a dietas normoproteicas ricas en sacarosa C0, C1, C2 y Alphalac. Previamente (una hora antes de la comida), se aplicó una inyección de butionina-sulfoximina, inhibidor de la síntesis del glutatión. Así, durante el período postprandial, se inhibe la neosíntesis del glutatión.

Se tomaron muestras de sangre 15, 45, 75 y 135 minutos después de finalizar la comida.

## 5 Resultados

En estado agudo, la inhibición de la síntesis de glutatión anula el efecto beneficioso de la suplementación con cisteína sobre la glucemia postprandial, lo que sugiere que el efecto de la cisteína sobre la regulación de la glucemia pasa por la síntesis del glutatión. A la inversa, la inhibición de la síntesis del glutatión no modifica el efecto de la  $\alpha$ -lactoalbúmina sobre la glucemia postprandial: por tanto, el efecto beneficioso de la  $\alpha$ -lactoalbúmina sobre la regulación de la glucemia es independiente de la síntesis del glutatión, lo que sugiere un efecto propio de la  $\alpha$ -lactoalbúmina sobre la regulación de la glucemia (Figura 6).

### Ejemplo 4: Estudio del efecto a largo plazo de una suplementación con cisteína en la vía de señalización de la insulina

#### Metodología

15 Cuatro grupos de 8 ratas machos de la cepa Wistar Hannover fueron sometidos durante 6 semanas a las mismas dietas con sacarosa que las utilizadas en los Experimentos 2 y 3 (P14 con sacarosa, C1, C2 y Alphalac). Se añadió un grupo adicional de 8 ratas, grupo de control sin sacarosa, alimentadas con una dieta P14 con un 14% de la energía de proteínas de leche total sin sacarosa. Este grupo constituye el control positivo "normal" o "sano" en la evaluación de las modificaciones de la vía de señalización de la insulina ligadas a la dieta hipersacarosada.

20 Se evalúa la tolerancia oral a la glucosa de las ratas antes de introducir las dietas y después a las 5 semanas por medio de una prueba de provocación oral a la glucosa. Después de un ayuno de al menos 8 horas, las ratas reciben una dosis de  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  de glucosa. Extracciones de sangre realizadas en la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos después del bolo de glucosa permiten seguir las cinéticas postglucosa de la glucemia y de la insulinemia plasmáticas (Figura 7 y 8).

25 A las 3 semanas, se tomó una muestra de sangre en ayunas para seguir la evolución de los parámetros metabólicos y del glutatión sanguíneo (Figura 9).

A las 6 semanas, las ratas anestesiadas reciben una dosis de  $0,750 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1}$  de insulina directamente inyectada en la vena cava. Esta inyección permite activar la vía de señalización de la insulina y evaluar las diferencias de activación entre los distintos grupos. 5 minutos después de la inyección, se extraen el músculo y el hígado, se trituran en un tampón de lisis y se inmunoprecipitan directamente con un anticuerpo que reconoce la proteína IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1). Las muestras inmunoprecipitadas se depositan después sobre gel y se transfieren a una membrana (técnica del Western Blot). Las membranas son hibridadas sucesivamente con un anticuerpo antifosfotirosina (la fosforilación de tirosina de la proteína IRS es la primera etapa de la vía de señalización de la insulina) y luego con un anticuerpo anti-IRS1 total (Figura 10).

35 En el momento de su sacrificio, se tomaron muestras sanguíneas y tisulares para otros análisis bioquímicos. Esta técnica permite evaluar directamente la sensibilidad a la insulina.

#### Resultados

##### 1. Glutatión sanguíneo a las 3 semanas, glutatión tisular a las 6 semanas

Como se muestra en la Figura 9 y la tabla a continuación, la relación GSH sanguíneo en ayunas (glutatión oxidado/glutatión total) es notablemente más baja en las ratas C1, C2 y Alphalac, en comparación con las ratas P14 y P14 con sacarosa (P14S), con un efecto más marcado en las ratas alimentadas con Alphalac. Esta diferencia se explica a la vez por un aumento significativo del glutatión total en las ratas C1, C2 y Alphalac y por una disminución significativa del glutatión oxidado en las ratas C2 y Alphalac. Estos resultados confirman que las dietas C1, C2 y Alphalac se asocian a un estrés oxidativo menor.

#### Relación GSH en % tras 6 semanas de régimen

	Hígado	Músculo	Corazón
P14	$1,3^{ab} \pm 0,5$	$3,7^a \pm 1,4$	$9,1^b \pm 1,9$
P14S	$1,7^b \pm 0,5$	$10,6^b \pm 5,4$	$12,2^a \pm 3,4$
C1	$1,0^{ac} \pm 0,6$	$5,5^a \pm 3,7$	$9,9^{ab} \pm 4,6$
C2	$0,7^c \pm 0,2$	$4,8^a \pm 4,0$	$8,3^b \pm 2,7$

Alphalac	$0,9^a \pm 0,3$	$3,9^a \pm 1,7$	$10,2^{ab} \pm 2,7$
----------	-----------------	-----------------	---------------------

Los promedios que comparten un mismo índice no son significativamente diferentes.

## 2. Prueba oral de tolerancia a la glucosa a las 5 semanas de dieta

La prueba de tolerancia oral a la glucosa realizada a las 5 semanas confirma los resultados del Ejemplo 2 con relación a la regulación de la glucemia. Las ratas suplementadas con cisteína y las ratas alimentadas con la dieta Alphalac presentan mejor tolerancia a la glucosa que las ratas de control: la hiperglucemia y la hiperinsulinemia provocadas por la carga oral de la glucosa son menos importantes en los grupos C1, C2 y Alphalac que en el grupo P14S.

De nuevo, el efecto del Alphalac es más importante que el de la dieta C1 con dosis equivalentes de cisteína: la  $\alpha$ -lactoalbúmina es más eficaz que la cisteína pura.

10 La información adicional que proporciona este estudio con respecto al estudio 2 es la comparación con el control P14 sin sacarosa. Tanto para la glucemia como para la insulinenia, los grupos C2 y Alphalac no son diferentes del control P14 sin sacarosa (Figura 7 y 8, tabla siguiente). Estos resultados sugieren que la dosis C2 de cisteína y la  $\alpha$ -lactoalbúmina anulan el efecto deletéreo de la sacarosa sobre la regulación de la glucemia.

### TOTG: Área bajo la curva a 5 semanas

	Glucosa	Insulina
P14	$2848,1^a \pm 953,9$	$0,25^a \pm 0,11$
P14S	$3875,6^b \pm 929,8$	$0,42^b \pm 0,08$
C1	$3583,1^b \pm 980,2$	$0,37^b \pm 0,15$
C2	$2411,2^a \pm 1044,8$	$0,25^a \pm 0,14$
Alphalac	$2351,2^a \pm 585,1$	$0,35^a \pm 0,20$

15 Los promedios que comparten un mismo índice no son significativamente diferentes.

## 3. Activación de la vía de señalización de la insulina

Los resultados obtenidos durante las pruebas de tolerancia a la glucosa se confirman y concretan por el análisis de activación de la vía de señalización de la insulina.

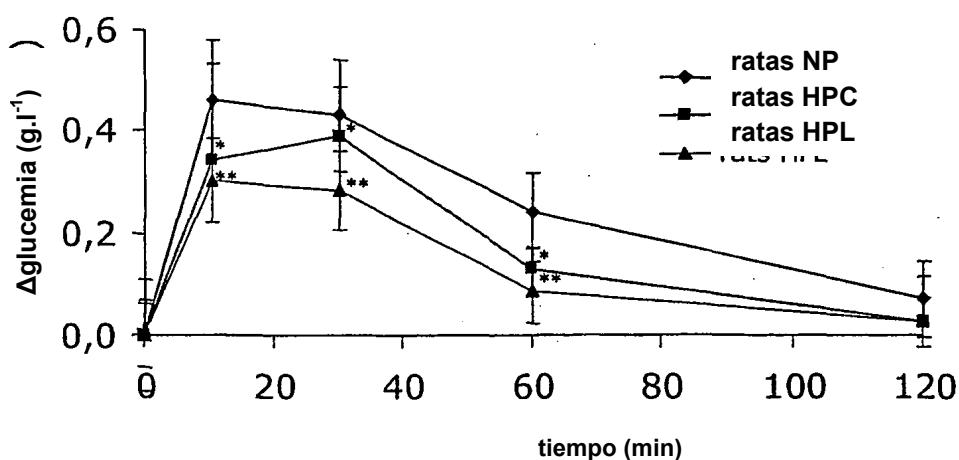
20 En el músculo, el porcentaje de proteína IRS1 fosforilada en tirosina era mucho más bajo en las ratas P14S que en las ratas P14 sin sacarosa (Figura 10). Nuestros resultados sugieren igualmente diferencias de expresión de la proteína IRS de un grupo a otro: en las ratas P14S, sería muy reducida y esta reducción se vería atenuada por la suplementación con cisteína con un dosis-efecto y por la  $\alpha$ -lactoalbúmina que tiene de nuevo un efecto equivalente a una fuerte dosis de cisteína.

A la inversa, en el hígado, no se ha medido ninguna diferencia, ni en porcentaje de proteína IRS fosforilada, ni tampoco 25 en la expresión de la proteína IRS.

Estos resultados demuestran la acción molecular de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y de la cisteína al nivel de la vía de señalización de la insulina y sugieren que la acción de la cisteína y de la  $\alpha$ -lactoalbúmina en la prevención de la intolerancia a la glucosa y la insulinorresistencia tiene lugar principalmente a nivel periférico.

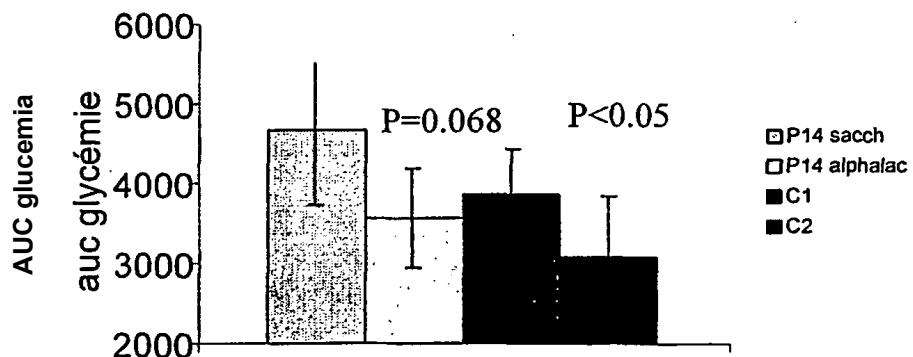
**REIVINDICACIONES**

1. Utilización de  $\alpha$ -lactoalbúmina para prevenir la intolerancia a la glucosa y/o para prevenir o tratar la aparición de resistencia a la insulina, caracterizada porque la  $\alpha$ -lactoalbúmina se utiliza en una dosis diaria comprendida entre 2 y 100 gramos.
- 5    2. Utilización según la reivindicación 1 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, para la preparación de una composición dietética.
3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque proviene de leche humana, de leche de vaca, de cabra, de oveja, de yegua o de búfala.
4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque ésta se utiliza en una dosis diaria comprendida entre 10 y 80 g.
- 10    5. Utilización según la reivindicación 4 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque ésta se utiliza en una dosis diaria comprendida entre 20 y 70 g.
6. Utilización según la reivindicación 5 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque ésta se utiliza en una dosis diaria comprendida entre 30 y 50 g.
- 15    7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque la dosis diaria de  $\alpha$ -lactoalbúmina representa entre el 10 y el 80% en peso del consumo diario total de proteínas de un individuo.
8. Utilización según la reivindicación 7 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque la dosis diaria de  $\alpha$ -lactoalbúmina representa entre el 20 y el 70% en peso del consumo diario total de proteínas de un individuo.
- 20    9. Utilización según la reivindicación 8 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque la dosis diaria de  $\alpha$ -lactoalbúmina representa entre 30 y el 50% en peso del consumo diario total de proteínas de un individuo.
10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque la composición está destinada a su administración a un ser humano.
- 25    11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque la composición está destinada a su administración en el momento de las comidas, ventajosamente en un plazo que oscila entre una hora antes de la comida y un cuarto de hora después de la comida.
12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque se utiliza en forma de un lactosuero enriquecido con al menos un 30% en peso de  $\alpha$ -lactoalbúmina, con relación al peso total de proteínas.
- 30    13. Utilización según la reivindicación 12 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque se utiliza en forma de un concentrado de proteínas de lactosuero enriquecido con al menos un 40% en peso de  $\alpha$ -lactoalbúmina, con relación al peso total de proteínas.
14. Utilización según la reivindicación 13 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque se utiliza en forma de un concentrado de proteínas de lactosuero enriquecido con al menos un 50% en peso de  $\alpha$ -lactoalbúmina, con relación al peso total de proteínas.
- 35    15. Utilización según la reivindicación 2 de  $\alpha$ -lactoalbúmina, caracterizada porque la composición dietética comprende al menos un 50% de proteínas.

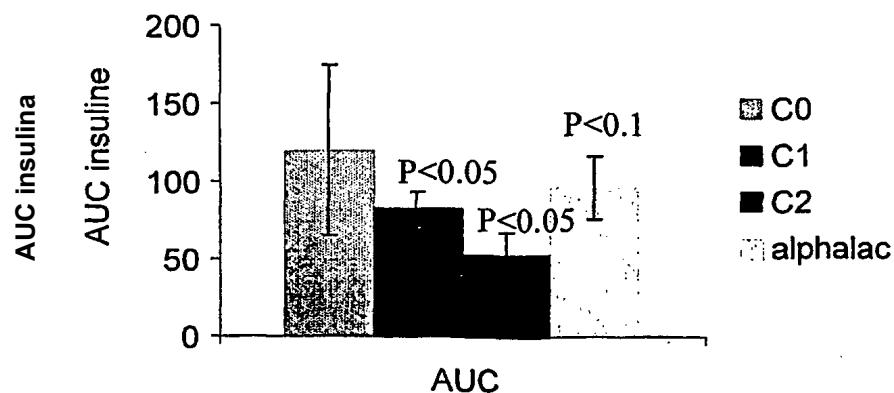


Efecto dieta:  $p = 0,03$    \*\*  $p < 0,05$  vs NP; \*  $p < 0,1$  vs NP

**Figura 1:** Tolerancia oral a la glucosa, comparación de dietas normo/hiperproteicas



**Figura 2:** Glucemia postprandial después de una primera comida experimental



**Figura 3:** Insulinemia postprandial después de una primera comida experimental

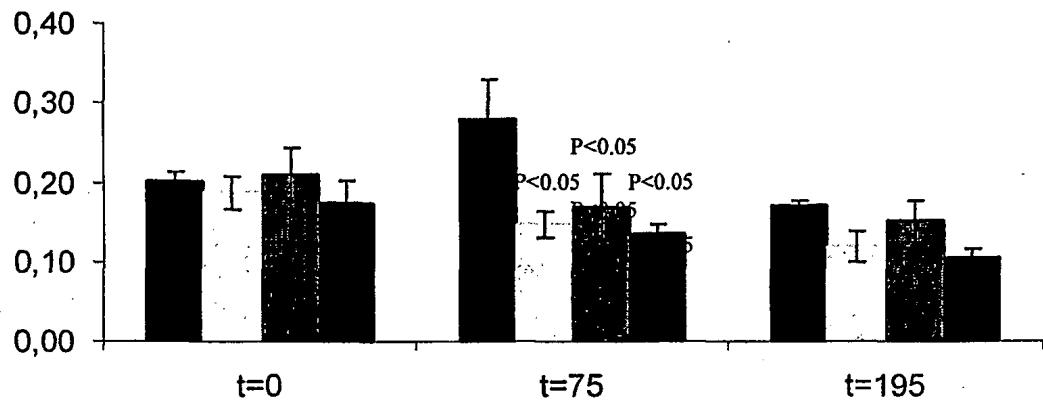


Figura 4: Evaluación de la relación glutatión sanguíneo / glutatión total

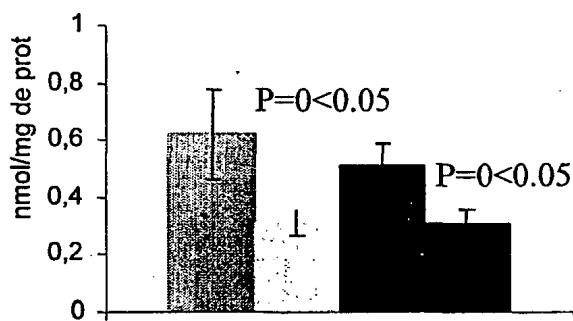


Figura 5: Evaluación de las proteínas carboniladas plasmáticas

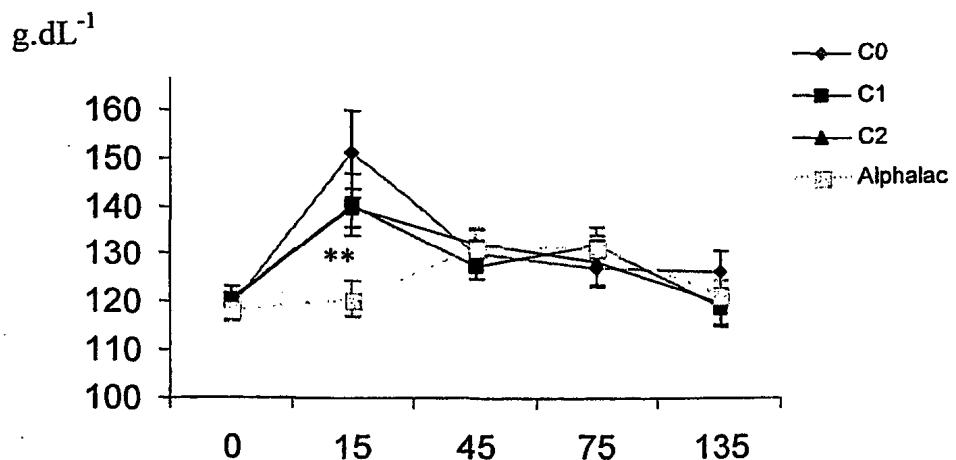
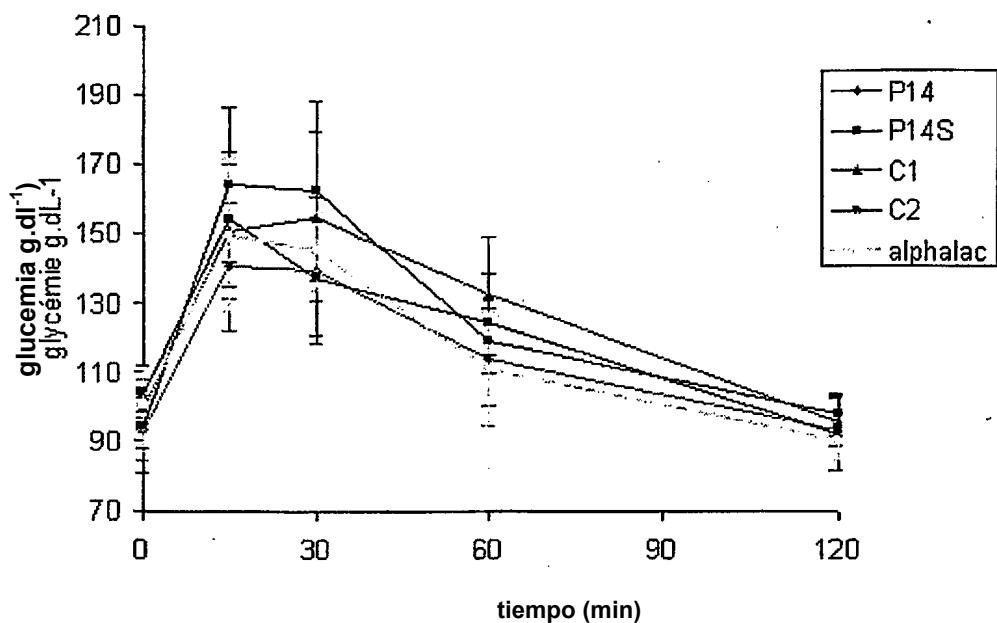
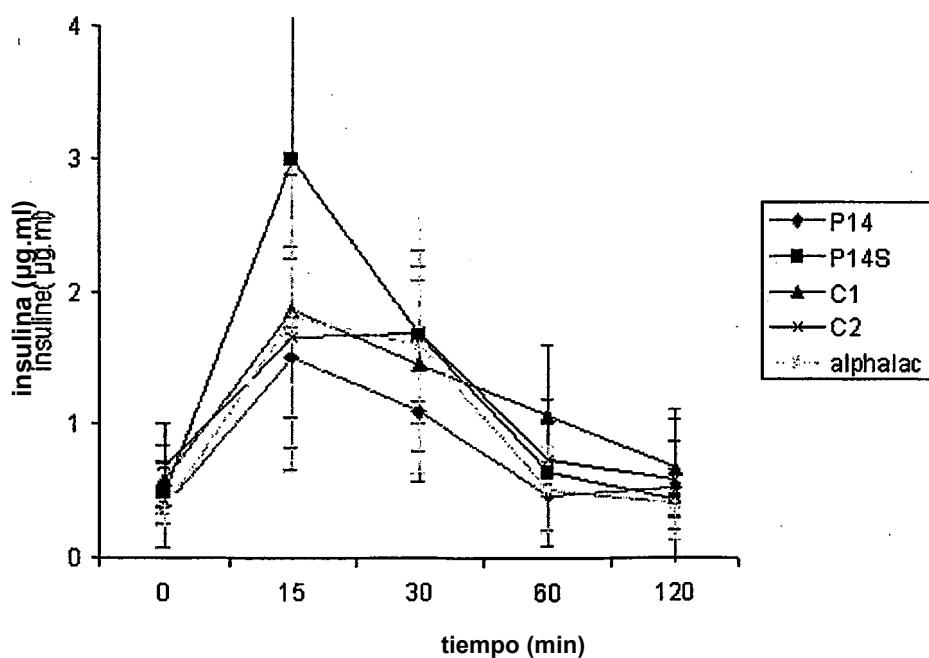


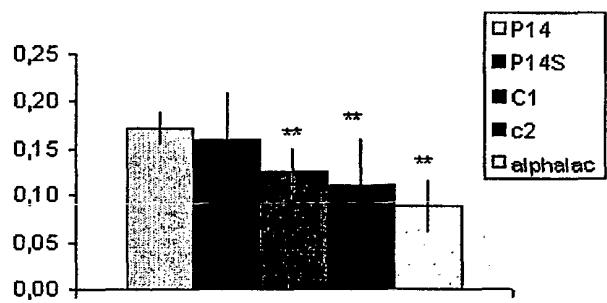
Figura 6: Glucemia postprandial en fase de inhibición de la síntesis del glutatión



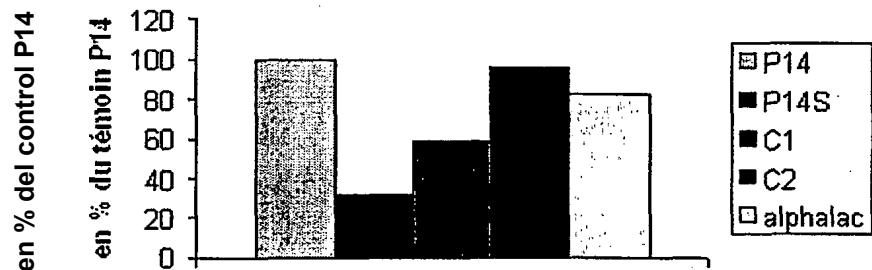
**Figura 7:** Prueba de tolerancia a la glucosa después de 5 semanas de dieta con sacarosa



**Figura 8:** Medición de la insulina después de 5 semanas de dieta con sacarosa



**Figura 9:** Medición del glutatión sanguíneo en ayunas después de 3 semanas de dieta con sacarosa



**Figura 10:** Medición de las proteínas IRS fosforiladas después de un dieta con sacarosa