

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 934**

51 Int. Cl.:

A61K 36/064 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

A61K 31/736 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2004 E 04763951 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 1663266**

54 Título: **Cortezas de levaduras para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia o para la estabilización de la glucemia**

30 Prioridad:

11.08.2003 EP 03018222

08.09.2003 EP 03020253

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

04.06.2013

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)
41, RUE ETIENNE MARCEL
75001 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

LESAFFRE, LUCIEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 405 934 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cortezas de levaduras para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia o para la estabilización de la glucemia

La presente invención se refiere al tratamiento y la prevención de la hiperglucemia, así como a la estabilización de la glucemia.

- 5 Numerosos compuestos ya han sido propuestos para la prevención de la hiperglucemia, para el tratamiento de la hiperglucemia y/o para la estabilización de la glucemia, en particular de la diabetes.

Así se han propuesto productos a base de levadura, en particular como levadura como tal, extracto de levadura, un factor de tolerancia a la glucosa a base de cromo (GTF) extraído de una levadura enriquecida en cromo, y también una preparación celular de levadura de cerveza.

- 10 Por lo tanto, el documento JP-A-61-167622 propone un agente de control contra la diabetes a base de una fracción celular de levadura de cerveza y denominada pared celular en este documento y obtenida por hidrólisis de la levadura de cerveza desamargada durante al menos 2 horas a una temperatura de 50 a 70°C y la extracción acuosa de los componentes solubles en agua. Dicha fracción celular de levadura de cerveza presenta en particular un contenido en glucógeno de aproximadamente 14,8%, un contenido en mananos de alrededor de 13,9%. Dicha
15 fracción celular presenta asimismo un contenido de glucógeno de aproximadamente 24,9%. El glucógeno o almidón hepático (en Inglés: "liver starch"; en alemán "Leberstärke") es un polisacárido de reserva asimismo presente en los músculos y en particular en el hígado. Este glucógeno asimismo es una sustancia de reserva de la levadura, utilizada por ésta como fuente de energía para su supervivencia. Cuando es uno de los componentes principales de la fracción celular descrita en esta solicitud de patente japonesa, no forma parte de la pared celular de las levaduras.

- 20 Según la presente invención, se ha constatado ahora que es posible obtener cortezas de levadura eficaces como agente para la prevención y el tratamiento de la hiperglucemia y que presentan un pequeño contenido en glucógeno, pudiendo obtenerse dichas cortezas de levadura por un procedimiento de autólisis o de hidrólisis enzimática simple.

- El término "corteza de levadura" se refiere a la fracción insoluble de las células de levadura, no enriquecida en cromo, obtenida después de una autólisis o hidrólisis enzimática, esencialmente por las proteasas, dando como
25 resultado la disolución de al menos 50% y preferentemente al menos 60% en peso de materia seca de células de levadura enteras y que conservan los polisacáridos de la estructura de la pared celular, es decir, los β -glucanos y los mananos, estando estos mananos en forma de manoproteínas.

- Esta autólisis o hidrólisis enzimática se lleva a cabo con el fin de disolver la mayoría de los azúcares de almacenamiento de la célula de levadura que son el glucógeno y la trehalosa. Las cortezas de levadura se obtienen
30 por separación de la fracción disuelta por autólisis o hidrólisis enzimática, teniendo ésta una duración preferentemente de al menos 18 horas. Los procedimientos preferidos de autólisis de cremas de levadura se describen en las páginas 370 a 377 en la obra de referencia "Yeast Technology", 2ª edición, 1991, G. Reed y T.W. Nogodawithana, publicada por Van Nostrand Reinhold, Nueva York, ISBN 0-442-31892-8. Las cortezas de levadura obtenidas de este modo se secan a continuación normalmente por un procedimiento clásico de secado, como el
35 secado por atomización o el secado sobre rodillos calientes.

Las cortezas de levadura según la invención son cortezas de levaduras *Saccharomyces* que pertenecen preferentemente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

- Dichas levaduras son preferentemente levaduras de panadería. Una levadura de panadería es una levadura que pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, fabricada utilizando esencialmente una multiplicación o cultivo
40 aerobio como se enseña en la obra de referencia "Yeast Technology" citada anteriormente y no habiéndose utilizado antes su autólisis o hidrólisis enzimática en ningún uso, a diferencia de, por ejemplo, la levadura de cerveza que es un subproducto de la fabricación de cerveza y que se ha utilizado para fabricar cerveza antes de su recuperación para su autólisis o hidrólisis enzimática. Esta levadura de cerveza se ha multiplicado sustancialmente en medio anaerobio (siendo la fabricación de cerveza un proceso anaerobio).

- 45 Las cortezas de levadura según la invención presentan un contenido total en glucano y mananos de la pared celular (expresado siempre en equivalente en peso equivalente de glucosa y manosa, respectivamente - véase a continuación los métodos de medición) de al menos 34,0% en peso en materia seca, así como un contenido en glucógeno (expresado siempre en peso equivalente de glucosa - véase los métodos de medición más adelante) inferior al 10,0% en peso de materia seca.

- 50 Preferentemente, las cortezas de levadura según la invención tienen un contenido total en glucanos y mananos de al menos 40,0% en peso de materia seca, aún más preferentemente de al menos 45,0% en peso de materia seca.

Asimismo, preferentemente, las cortezas de levadura según la invención tienen un contenido en glucógeno inferior al

8,0% en peso de materia seca, aún más preferentemente inferior al 5,0% en peso de materia seca e incluso más preferentemente inferior al 3,0% en peso de materia seca.

De manera útil, las cortezas de levadura según la invención tienen un contenido en proteínas del 17,0 a 35,0% en peso de materia seca, preferentemente de 18,0 a 26,0% en peso de materia seca.

- 5 Curiosamente, las cortezas de levadura según la invención tienen un contenido en materia seca de al menos 90% en peso, preferentemente, de al menos 94% en peso y más preferiblemente al menos 96% en peso .

En general, el contenido total en glucanos y mananos en la corteza de levadura según la invención es inferior o igual al 70% en peso de materia seca. En particular, puede ser inferior o igual a 65% en peso de materia seca. También puede ser menor o igual a 55% en peso de materia seca.

- 10 Según una variante de la invención, para eliminar por completo o casi por completo el glucógeno de la corteza de levadura, las cortezas de levadura según la invención obtenidas como se ha descrito anteriormente se ponen en suspensión acuosa, se calientan en medio alcalino entre 70°C y 100°C durante tres horas máximo, y se elimina la fracción disuelta por este tratamiento, recuperándose la fracción no disuelta restante y secándose por lo general. Por ejemplo, una suspensión de alrededor de 12% de materia seca de cortezas de levadura en medio acuoso alcalino de
15 sosa puede calentarse a 85°C durante dos horas. La fracción disuelta que contiene toda el glucógeno, pero también una gran parte, o la totalidad, de las manoproteínas se elimina por centrifugación y lavado.

- Dicho tratamiento permite realizar cortezas de levadura según la invención con un contenido total en glucanos y mananos de 55% a 70% en peso de materia seca, preferentemente de 60% a 70% en peso y aún más preferentemente de 60 a 65% en peso de materia seca. Dicho tratamiento permite realizar principalmente cortezas
20 de levadura que contiene menos de 1,0% en peso de glucógeno de materia seca, preferentemente menos de 0,1% en peso de materia seca de glucógeno. Estas cortezas de levadura pueden no contener mananos.

Estas cortezas de levadura con un contenido total elevado en glucanos y mananos corresponden a una forma de realización de un agente según la invención para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, o para la estabilización de la glucemia.

- 25 Son apropiadas para las preparaciones según la invención para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, o para la estabilización de la glucemia. Pueden utilizarse, según la invención, en la preparación de una composición terapéutica para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia o para la estabilización de la glucemia.

Método para la medida del contenido en glucógeno

- 30 A una muestra de 20 mg de cortezas de levadura secas, es decir, con un contenido de materia seca de al menos 90% en peso, 0,5 ml de Na₂CO₃ 0,25 M y esta mezcla se mantiene a 95°C durante 4 horas.

A continuación la mezcla se lleva a pH 5,2 por adición de 0,3 ml de ácido acético 1 M y 1,2 ml de acetato sódico 0,2 M y se mezclan los ingredientes. Se añade agua destilada hasta un volumen total de 2 ml.

- 35 Se incuban durante 15 horas 0,5 ml de la suspensión obtenida de este modo en presencia de un exceso de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, como el comercializado por la sociedad Roche bajo el número Cat. n° 102 857, a 55°C.

Después de la centrifugación, se dosifica la glucosa dosis liberada por dosificación enzimática.

- La dosificación enzimática de la glucosa se describe en particular en el manual de "Methods of Biochemical Analysis and Food Analysis - using Single Reagents", publicado por BOEHRINGER MANNHEIM GmbH Biochemica, ©
40 1989, páginas 50 a 55, y se realiza preferentemente utilizando el "Test-Combination D-Glucose/-Fructose" Cat. N° 139 106 de la filial de la sociedad ROCHE: Boehringer MANNHEIM GmbH/ R-BIOPHARM GmbH, en Darmstadt, Alemania.

La cantidad (en mg) de glucosa dosificada de este modo corresponde a la cantidad de glucógeno presente en la muestra, expresada en peso equivalente de glucosa.

Método para la medida del contenido total de glucanos y mananos

Una muestra de 20 mg de levadura seca, es decir, con un contenido de materia seca de al menos 90% en peso, se somete a una hidrólisis ácida mezclándola con 20 ml de HCl 2 N, y la mezcla se mantiene en un tubo cerrado a rosca durante 4 horas a 103°C en estufa con agitación cada 15 min.

- 5 A continuación, se neutraliza la solución ácida así obtenida y se administra por vía enzimática la cantidad de glucosa y manosa, respectivamente, en la solución neutralizada.

Esta administración enzimática de glucosa y manosa también se describe en las páginas 50 a 55 del manual mencionado anteriormente y se realiza preferentemente utilizando la "Test-Combination" Cat. nº 139 106.

- 10 Se hace una distinción entre, por una parte la cantidad de glucosa (expresada en mg) administrada por este método y la cantidad de glucosa (expresada también en mg) administrada a estas cortezas de levadura por el método para la medición del contenido de glucógeno anteriormente.

Esta diferencia (en mg) entre las dos cantidades de glucosa administradas corresponde a la cantidad total de glucanos presente en la muestra, expresándose esta cantidad en peso equivalente de glucosa.

- 15 La cantidad (en mg) de manosa administrada corresponde a la cantidad total de mananos presente en la muestra, expresándose esta cantidad en peso equivalente de manosa.

La presente invención se refiere en primer lugar a un agente para utilización en el tratamiento de la hiperglucemia constituido por cortezas de levadura tales como las definidas anteriormente, es decir, las cortezas de levadura según la invención. El tratamiento de la hiperglucemia se refiere principalmente a la reducción de la glucemia, es decir, del índice de glucosa en sangre.

- 20 Este agente según la invención puede ser útil en varios casos de hiperglucemia, especialmente como los casos que se enumeran a continuación:

(a) para el tratamiento de la hiperglucemia en caso de diabetes tipo 2 (la diabetes de tipo 2 se denomina en lo sucesivo "enfermedad (a)");

- 25 (b) para el tratamiento de la hiperglucemia en caso de diabetes de gestación o embarazo (la diabetes de gestación o embarazo se denomina en lo sucesivo ser "enfermedad (b)");

(c) para el tratamiento de la hiperglucemia en caso de prediabetes (la prediabetes se denomina en lo sucesivo "enfermedad (c)");

(d) para el tratamiento de la hiperglucemia posprandial (el estado posprandial se denomina en lo sucesivo "enfermedad (d)").

- 30 La presente invención se refiere asimismo a un agente para su utilización en la prevención de la hiperglucemia, estando constituido dicho agente por cortezas de levadura según la invención. La prevención de la hiperglucemia se refiere principalmente al mantenimiento de la glucemia en niveles inferiores a la hiperglucemia.

Dicho agente puede ser, en particular, un agente para utilización en la prevención de la hiperglucemia en caso de al menos una de las condiciones (a), (b), (c) o (d) tales como las definidas anteriormente.

- 35 La presente invención también se refiere a un agente para su utilización en la estabilización de la glucemia, estando constituido dicho agente por cortezas de levadura según la invención. La estabilización de la glucemia se refiere principalmente al mantenimiento de la glucemia a concentraciones inferiores a la hiperglucemia y superiores a la hipoglucemia.

- 40 Dicho agente puede ser, en particular, un agente para su utilización en la estabilización de la glucemia en el caso de al menos una de las condiciones (a), (b), (c) o (d).

El agente según la invención, en sus diversas formas de aplicación, se puede administrar en diferentes formas o presentaciones, solo o en combinación con otros ingredientes, como, por ejemplo, uno o varios otros ingredientes terapéuticamente activos y/o uno o varios excipientes.

- 45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una preparación para su utilización en el tratamiento de la hiperglucemia, que comprende cortezas de levadura según la invención, tales como las definidas anteriormente. Dicha preparación comprende en otras palabras un agente según la invención.

Dicha preparación según la invención puede ser, en particular, una preparación para su utilización en el tratamiento

de la hiperglucemia en el caso de al menos una de la condición (a), (b), (c) o (d).

La presente invención se refiere asimismo a una preparación para su utilización en la prevención de la hiperglucemia que comprende cortezas de levadura según la invención.

5 Dicha preparación puede ser, en particular, una preparación para su utilización en la prevención de la hiperglucemia en el caso de al menos una de las condiciones (a), (b), (c) o (d).

La presente invención también se refiere a una preparación para su utilización en la estabilización de la glucemia, que comprende corteza de levadura según la invención.

Dicha preparación puede ser, en particular, una preparación para su utilización en la estabilización de la glucemia en caso de al menos una de las condiciones (a), (b), (c) o (d).

10 La preparación según una cualquiera de las formas de realización anteriores es generalmente una preparación para administración por vía oral.

La preparación puede presentarse en particular en forma de comprimido, cápsula, píldora, polvo, gránulos o suspensión.

15 La preparación según la invención puede comprender asimismo uno o varios agentes terapéuticamente activos, y especialmente uno o varios agentes hipoglucémicos. La preparación puede incluir por lo tanto una o varias vitaminas, uno o varios minerales dietéticos, etc.

La preparación puede comprender asimismo uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 La preparación según la invención puede presentarse, en particular en forma de una dosis de ingestión correspondiente a una cantidad de materia seca de cortezas de levadura según la invención inferior a 10 g, preferentemente de 1 a 8 g, aún más preferentemente de 1 a 7 g.

Ejemplos

A. Procedimiento de obtención de cortezas levadura según la invención

25 Una crema acuosa (es decir, una suspensión de células de levadura en agua) de *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene un contenido en materia seca entre 12 y 18% en peso se somete a hidrólisis con la ayuda de enzimas endógenas de dichas células de levadura, opcionalmente con la adición de proteasas exógenas a las células de levadura, tales como por ejemplo la papaína. La hidrólisis se efectúa a 50°C durante 24 horas, a fin de disolver al menos 60% en peso de materia seca de las células de levadura.

En la práctica, en general, las autólisis o hidrólisis enzimáticas según la invención se llevan a cabo entre 45°C y 55°C durante 18 a 36 horas sin utilización de ninguna enzima capaz de disolver los glucanos o las manoproteínas.

30 La fracción disuelta se separa de la fracción insoluble por varias etapas sucesivas de centrifugación y lavado con agua.

La fracción insoluble se seca en tambores calentados hasta un contenido en materia seca de 95% en peso. Los aglomerados formados se separan mediante tamizado.

Las cortezas de levadura obtenida de este modo presentan:

- 35
- un contenido en materia seca de 95% en peso,
 - un contenido en proteínas Nx6,25 de 20,2% en peso de materia seca
 - un contenido total en glucanos y mananos de 43% de materia seca
 - un contenido de glucógeno de 8% en peso de materia seca.

B. Prevención y tratamiento de la hiperglucemia por medio de una preparación según la invención

40 Una paciente inválida de 82 años fue diagnosticado de diabetes tipo 2.

Al no poder participar en ejercicios físicos exigentes, el tratamiento inicial se limitaba a un régimen con bajo contenido en grasas y azúcares digeribles.

El efecto realizado gracias a este régimen era limitado. Se observó en particular que la glucemia de la paciente se

mantenía en un contenido de glucosa en sangre de 10,0 a 12,0 mmol/litro, sabiendo que se buscaba un contenido de glucosa en sangre entre 4,0 y 7,0 mmol/l, preferentemente entre 4,2 y 6,0 mmol/l.

Por consiguiente, el régimen anteriormente mencionado se ha complementado con la adición de 3 a 4 g de cortezas de levadura tales como las descritas en el punto A anteriormente, a los cereales del desayuno.

- 5 12 horas después de la primera ingestión de dichas cortezas de levadura, la glucemia de la paciente había descendido a 6 mmol de glucosa en sangre / litro.

Continuando con la ingestión de 3 a 4 g de corteza de levadura al día durante el desayuno, la glucemia de la paciente se mantuvo durante al menos 4 meses entre 4,5 y 6 mmol de glucosa en sangre / litro.

- 10 No se ha producido hiperglucemia posprandial durante estos 4 meses, incluso después de las infracciones al régimen alimentario prescrito, como el consumo de chocolate.

No se ha observado ningún efecto secundario negativo.

REIVINDICACIONES

1. Agente para su utilización en el tratamiento de la hiperglucemia, estando constituido el agente por cortezas de levadura del género *Saccharomyces cerevisiae*, teniendo dichas cortezas de levadura:
- 5 • un contenido total de glucanos y mananos de al menos 34,0% en peso de materia seca, preferentemente de al menos 40,0% en peso de materia seca y más preferentemente de al menos 45,0% en peso de materia seca, y
 - un contenido de glucógeno inferior al 10,0% en peso de materia seca, preferentemente inferior al 8,0% en peso de materia seca, más preferentemente inferior al 5,0% en peso de materia seca, y más preferentemente aún inferior al 3,0% en peso de materia seca.
- 10 2. Agente para su utilización según la reivindicación 1, en el que las cortezas de levadura tienen un contenido total en glucanos y mananos inferior o igual al 70% en peso de materia seca.
3. Agente para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que las cortezas de levadura tienen un contenido total en glucanos y mananos de 55% a 70% en peso de materia seca, preferentemente de 60% a 70% en peso, y aún más preferentemente de 60% a 65% en peso de materia seca.
- 15 4. Agente para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las cortezas de levadura tienen un contenido de glucógeno inferior al 1,0% en peso de materia seca, preferentemente inferior al 0,1% en peso de materia seca.
5. Agente para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las cortezas de levadura tienen un contenido en materia seca superior o igual al 90%, preferentemente superior o igual al 94% y aún más preferentemente superior o igual al 96% de peso.
- 20 6. Agente para su utilización en la prevención de la hiperglucemia, agente que está constituido por cortezas de levadura tales como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Agente para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que la hiperglucemia es una hiperglucemia en caso de diabetes de tipo 2.
- 25 8. Agente para su utilización en la estabilización de la glucemia, agente que está constituido por cortezas de levadura tales como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Agente para su utilización según la reivindicación 8 para la estabilización de la glucemia en caso de diabetes de tipo 2.
- 30 10. Preparación para su utilización en el tratamiento de la hiperglucemia, preparación que comprende cortezas de levadura tales como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
11. Preparación para su utilización en la prevención de la hiperglucemia, preparación que comprende cortezas de levadura tales como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
12. Preparación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, caracterizada por el hecho de que la hiperglucemia es una hiperglucemia en caso de diabetes de tipo 2.
- 35 13. Preparación para su utilización en la estabilización de la glucemia, preparación que comprende cortezas de levadura tal como las definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
14. Preparación para su utilización según la reivindicación 13 para la estabilización de la glucemia en caso de diabetes de tipo 2.