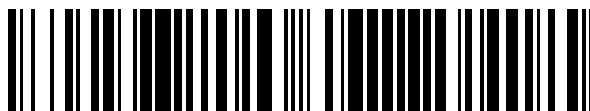


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 647**

51 Int. Cl.:

A61K 36/064 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012 E 12750344 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2739295**

54 Título: **Formulaciones que comprenden Saccharomyces boulardii y superóxido dismutasa para el control de la obesidad**

30 Prioridad:

03.08.2011 IT MI20111488

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**GNOSIS S.P.A. (100.0%)
Piazza del Carmine 4
20121 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**CASTAGLIUOLO, IGNAZIO;
BRUN, PAOLA;
BUSIELLO, IMMACOLATA y
MIRAGLIA, NICCOLÒ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 562 647 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

Formulaciones que comprenden *Saccharomyces boulardii* y superóxido dismutasa para el control de la obesidad

La presente invención se refiere a formulaciones útiles como complementos dietéticos que contienen la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii* y la enzima antioxidante superóxido dismutasa. Las formulaciones según la invención resultan útiles para reducir el riesgo de desarrollar el síndrome metabólico relacionado con la obesidad.

Estado de la técnica

La obesidad se define como un estado de exceso de grasa corporal, y se asocia con un gran número de disfunciones, incluyendo enfermedad cardiovascular (ECV) y diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID).

La prevalencia de la obesidad y el exceso de peso en adultos, niños y adolescentes ha crecido rápidamente en los últimos 30 años y sigue aumentando, resultando en un alto costo social.

La obesidad se considera en general como el resultado de una combinación de un consumo excesivo de energía y un estilo de vida sedentario, pero a pesar de que estos factores sean naturalmente importantes, se ha sugerido recientemente que la flora intestinal subóptima también influye (Tennyson CA, Friedman G. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* octubre de 2008; 15(5):422-7), mientras que las complicaciones metabólicas se asocian con la inflamación de bajo grado sistémica que se produce en individuos obesos (Fantuzzi G., *J Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115:911-919, Bäckhed F, Ding H, Wang T, *PNAS* 2004; 101:15718-15723).

Además, se ha demostrado que algunas especies de bacterias, tales como las bacterias productoras de ácido láctico en las especies *L. gasseri*, *L. casei* y *L. acidophilus*, son capaces de reducir el aumento de peso en ratas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos (Kang JH, Yun SI, Park HO, *J Microbiol.* octubre de 2010, 48(5):712-4. Epub 3 de noviembre de 2010).

En apoyo de estos estudios, se ha descrito que los productos que contienen bacterias probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son capaces de prevenir o curar las disfunciones metabólicas causadas por la obesidad (documento WO 2010146568; documento WO 2010091992; documento US 2008267933).

Hasta la fecha, además de las propiedades bien descritas de las bacterias probióticas, numerosos artículos en la literatura científica han descrito algunos efectos beneficiosos en la salud de una levadura probiótica, tal como la inactivación de la toxina A de *Clostridium difficile* por la levadura *Saccharomyces boulardii* (Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Infect Immun.* enero de 1999; 67(1):302-7) y la eficacia de *Saccharomyces boulardii* para prevenir la diarrea causada por tratamientos con antibióticos o por infecciones debido a patógenos intestinales (Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, van Belle G. *Gastroenterology.* abril de 1989; 96(4):981-8; McFarland LV- *World J Gastroenterol.* mayo de 2010 14;16(18):2202-22).

La enzima superóxido dismutasa (SOD), cuando se administra por vía parenteral, ha demostrado ser eficaz en diversos trastornos inflamatorios (Carroll IM, y col. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* octubre de 2007; 293(4):G729-38; Oku T, y col. *Inflamm Bowel Dis.* julio de 2006; 12(7):630-40) reduciendo la formación de radicales libres y el daño tisular.

A pesar del número y el detalle de estos estudios, nunca se ha estudiado o propuesto una composición en base a levaduras probióticas capaz de evitar o contrarrestar la obesidad y los trastornos relacionados.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una composición que contiene una levadura probiótica y un antioxidante, que resulta útil para reducir el riesgo de desarrollar obesidad y el síndrome metabólico relacionado con ello.

La levadura probiótica presente en la composición, capaz de reducir el riesgo de desarrollar el síndrome metabólico relacionado con la obesidad, pertenece al género *Saccharomyces*, y a la especie *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (en lo sucesivo denominada Sb).

La sustancia antioxidante utilizada en combinación con la levadura probiótica Sb pertenece a la clase de enzimas antioxidantes, y es la enzima superóxido dismutasa (en lo sucesivo denominada SOD).

La SOD se prepara preferentemente en forma gastroprotegida mediante técnicas y excipientes convencionales. La dosis eficaz de la levadura probiótica oscila entre 10^6 y 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por administración diaria, preferentemente aprox. 10^7 UFC, mientras que la dosis eficaz de SOD oscila entre 1 y 100 mg, preferentemente entre 2 y 50 mg, y más preferentemente entre 5 y 20 mg por día. Se prefiere particularmente una dosis de aprox. 10 mg por día.

La levadura y la SOD también podrían administrarse de forma simultánea, por separado o de forma secuencial: en tal caso, los dos principios activos no requieren asociarse en una única dosis unitaria, y podrían utilizarse

opcionalmente en un producto en forma de kit que comprende formas de dosificación distintas para los dos principios activos.

5 Se ha evaluado la eficacia del complemento dietético proporcionado por la presente invención controlando las propiedades físicas, tales como el peso, la acumulación de grasa abdominal, y la ingesta de alimentos, y midiendo algunos parámetros bioquímicos, tales como los niveles de glucosa en sangre y de citocina proinflamatoria.

Se ensayó la eficacia de la composición según la invención como complemento dietético en un modelo murino de obesidad no genético obtenido en ratones macho de la línea C57BL/6, que habían recibido a partir de las 4 semanas de vida una dieta rica o normal en calorías complementada diariamente con Sb y SOD o con solo el transportador.

10 Durante la administración de 9 semanas del complemento dietético, se evaluaron semanalmente el peso corporal y la ingesta de alimentos.

Al final del periodo de administración, los animales se sometieron al ensayo de tolerancia a la glucosa tras permanecer en ayunas durante la noche; otros animales se sacrificaron para recoger la sangre periférica necesaria para cuantificar las citocinas circulantes y medir la grasa abdominal acumulada.

La invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

15 **Ejemplo 1:** Peso corporal, ingesta de alimentos y regulación de la grasa corporal.

20 A fin de evaluar la eficacia del complemento dietético que consiste en la composición de Sb y SOD en la regulación de las propiedades físicas influenciadas por la obesidad, se dividieron en grupos aleatorios ratones macho C57BL/6 (15,2 ± 0,3 g) de 4 semanas de vida a los que se les administró una dieta normal en calorías (77 % de carbohidratos, 19 % de proteínas y 4 % de grasa) o se les administró una dieta rica en calorías (VHF, 21 % de carbohidratos, 19 % de proteínas y 60 % de grasas) en presencia o ausencia de un complemento diario que consiste en 10⁷ UFC de Sb (administrado por sonda gástrica) y/o 10 mg de SOD extraídos de una levadura purificada y gastroresistente mediante la microencapsulación hasta una actividad específica de 180.000 U/g, e incorporados en el alimento. Sin embargo, otros procedimientos de gastroprotección, tales como el medio de películas de gliadina u otras técnicas equivalentes, producirían el mismo efecto y por consiguiente pueden considerarse equivalentes para fines de la presente invención.

Se administraron de forma continua los complementos alimenticios y dietéticos durante un total de 9 semanas.

La ingesta de alimentos de los animales (Tabla) y su peso corporal se controlaron semanalmente, mientras que la acumulación de la grasa visceral se cuantificó tras el complemento dietético de 9 semanas.

30 Al final del periodo experimental, los animales se sacrificaron y la grasa abdominal se recogió, se pesó cuidadosamente, y a continuación se fijó en formalina para los ensayos histológicos posteriores (Figura 2a).

El complemento dietético con Sb + SOD, pero no con solo Sb, reduce significativamente el aumento de peso asociado con una dieta rica en calorías (Figura 1). Además, la acumulación de tejido adiposo a nivel abdominal se redujo significativamente en animales que recibieron solo Sb y en aquellos que recibieron Sb en combinación con SOD (Figuras 2 y 2a).

35 **Tabla**

Dieta	Complemento	Ingesta de alimentos por ratón por día (g)	Ingesta calórica por ratón por día (Kcal)
Dieta normal en calorías	no	3,20	10,89
Dieta rica en calorías	no	4,76	28,71
Dieta rica en calorías	Sb	2,00	12,08
Dieta rica en calorías	Sb + SOD	2,00	12,05

Ejemplo 2: regulación de parámetros bioquímicos en la obesidad.

40 A fin de evaluar la eficacia del complemento dietético que consiste en la composición de Sb y SOD en las complicaciones asociadas con la obesidad tras 9 semanas del experimento descrito en el ejemplo 1, a los ratones se les sometió a una prueba de sobrecarga oral de glucosa y a un estudio de la cascada de señales inducida por insulina en un órgano diana (hígado).

Para realizar la prueba de tolerancia a glucosa oral, la glucosa en sangre se determinó tras un ayuno de 18 horas y antes de la administración de una sobrecarga oral de glucosa (2 mg/g de peso corporal).

La glucosa en sangre se determinó cada 30 minutos durante 120 minutos, y la tolerancia a la glucosa se calculó como el área bajo la curva (ABC) (Figura 3a y Figura 3b).

- 5 Para evaluar el estado funcional de la cascada de señales inducida por la insulina, a los ratones se les administró una sobrecarga de insulina por vía intraperitoneal (10 U/kg de peso). En este caso, los animales se sacrificaron 5 minutos más tarde, y se recogieron y congelaron las muestras hepáticas.

Las proteínas totales se extrajeron de las muestras hepáticas y se sometieron a inmunotransferencia para evaluar el nivel de fosforilación de la proteína del S1RI (sustrato 1 del receptor de insulina) (Figura 4).

- 10 En condiciones normales, la unión entre la insulina y su receptor provoca la fosforilación de la proteína de S1RI en el residuo Tyr941, mientras que en el caso del síndrome metabólico asociado con la obesidad, esta señal se reduce.

El complemento con Sb o Sb + SOD que utiliza las mismas preparaciones y las mismas dosis que en el Ejemplo 1 redujo el grado de la hiperglucemia posterior a la sobrecarga de glucosa asociada con la obesidad (Figuras 3a y 3b). La coadministración de Sb y SOD causó una reducción más marcada en la hiperglucemia posterior a la sobrecarga.

- 15 El complemento dietético en ratones obesos con Sb y SOD restaura la fosforilación de S1RI en el residuo Tyr941 en respuesta a la sobrecarga de glucosa en sangre, por consiguiente, corrige la insensibilidad de los tejidos diana a la insulina (Figura 4).

Ejemplo 3: Inflamación sistémica causada por la obesidad

- 20 Para evaluar la eficacia del complemento dietético que consiste en la composición de Sb y SOD en la inflamación sistémica, un estado común en estos individuos obesos, se tomó tras el complemento dietético de 9 semanas una muestra de sangre circulante para medir los niveles circulantes de la citocina proinflamatoria (FNT α) y una adipocina (leptina). El ensayo se realizó en suero utilizando el ensayo de ELISA (Figura 5 y Figura 6).

- 25 En el caso de los animales obesos, se observó un aumento en los niveles circulantes de FNT α y leptina, que contribuyen al desarrollo de las complicaciones sistémicas. El complemento dietético con Sb o Sb + SOD que utiliza las mismas preparaciones y las mismas dosis que en el Ejemplo 1 reduce significativamente los niveles circulantes de FNT α y leptina (Figura 5 y Figura 6). En particular, el nivel sérico de leptina, una adipocina proinflamatoria obtenida a partir del tejido adiposo con un papel en la regulación de la ingesta de alimentos, se reduce mediante el complemento con Sb + SOD en un intervalo significativamente superior incluso si se compara con complementos únicos de Sb y SOD (Figura 6).

- 30 **Ejemplo 4: Estado inflamatorio de la mucosa intestinal en la obesidad**

- A fin de evaluar la eficacia del complemento dietético que consiste en la composición de Sb y SOD en el estado inflamatorio de la mucosa asociada con la obesidad tras el complemento dietético de 9 semanas, los animales se sacrificaron para que se pudiese recoger un segmento de ileón. Los segmentos intestinales se homogeneizaron en tampón fosfato al que se añadió un cóctel de inhibidores de la proteasa para la extracción de las proteínas totales. El homogeneizado se centrifugó a 13.000x rpm durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante decantado se utilizó para cuantificar las citocinas proinflamatorias IL1- β y FNT α mediante el ensayo de ELISA y cuantificar el glutatión (GSH), el compuesto natural antioxidante más eficaz. Los niveles de citocina se normalizaron a los niveles de proteína total determinados por el método de Bradford.

- 40 En el caso de los individuos obesos, se observó en la mucosa intestinal un aumento en los niveles de IL1- β y FNT α , que contribuyen al desarrollo de las complicaciones sistémicas. El complemento dietético con Sb o la coadministración de Sb + SOD que utiliza las mismas preparaciones y las mismas dosis que en el Ejemplo 1 induce una reducción significativa en ambas citocinas (Figs. 7 y 8). Las Figuras 7 y 8 muestran claramente que solo la coadministración de Sb + SOD restaura IL1- β y FNT α en la mucosa intestinal a valores comparables con los ratones de control.

- 45 El glutatión (GSH), que presenta una potente actividad antioxidante y que puede relacionarse con un papel antiinflamatorio a nivel de la mucosa, muestra una reducción significativa en el ileón de los animales obesos. Su nivel aumenta sorprendentemente en caso de un complemento con Sb + SOD mientras que los complementos únicos con solo Sb o SOD no son eficaces (Figura 9).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* y la enzima superóxido dismutasa.
2. Una composición según la reivindicación 1, en la que la superóxido dismutasa se presenta en forma gastroprotegida.
- 5 3. Una composición según la reivindicación 1 o 2 en forma de kit, apropiada para la administración simultánea, por separado o secuencial.
4. La composición de la reivindicación 1, 2 o 3 para su uso como complemento dietético.
5. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en la prevención o la reducción del riesgo de desarrollar disfunciones metabólicas relacionadas con la obesidad.
- 10 6. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en la reducción del aumento de peso, en la reducción de la ingesta de alimentos, en la reducción de la acumulación de grasa corporal, y para la mejora del estado inflamatorio sistémico relacionado con la obesidad.

Figura 1

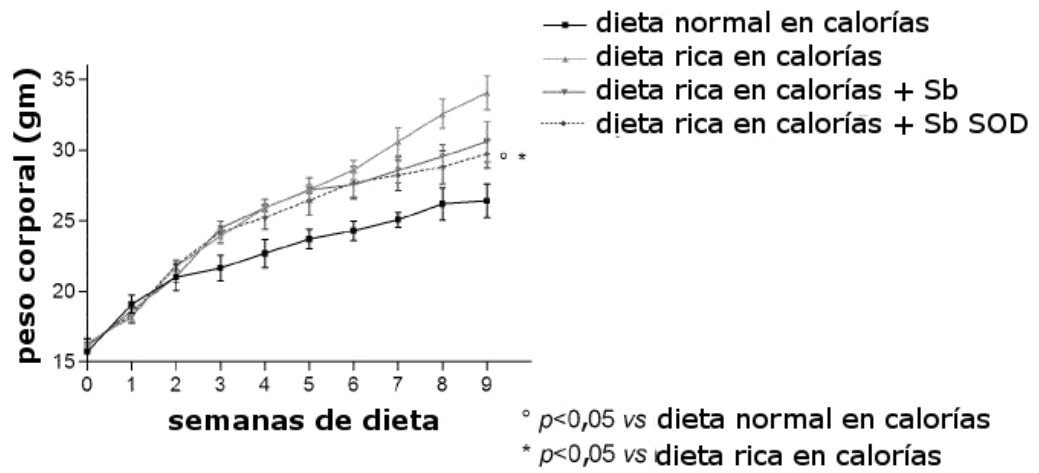


Figura 2

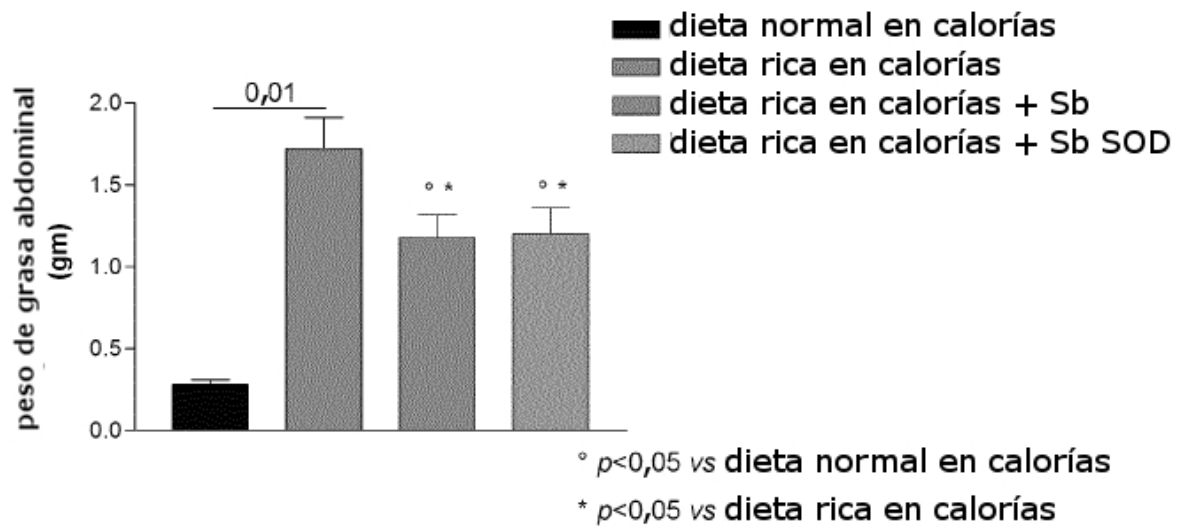
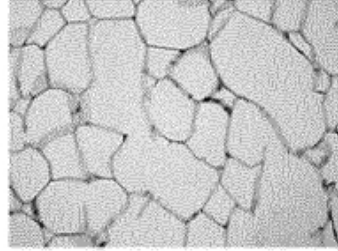
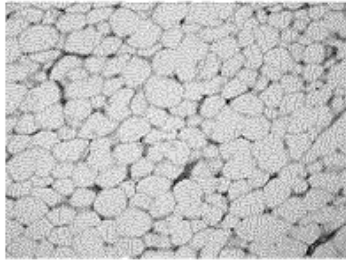


Figura 2a

dieta normal en calorías dieta rica en calorías



dieta rica en calorías + Sb dieta rica en calorías + Sb SOD

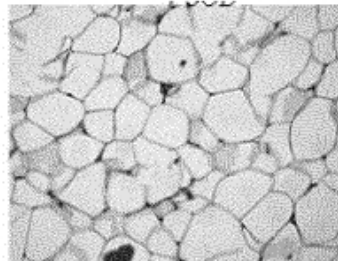
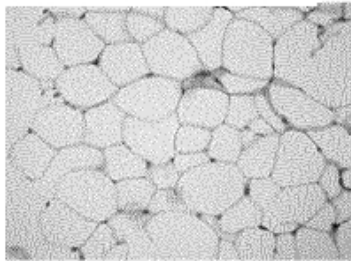


Figura 3a

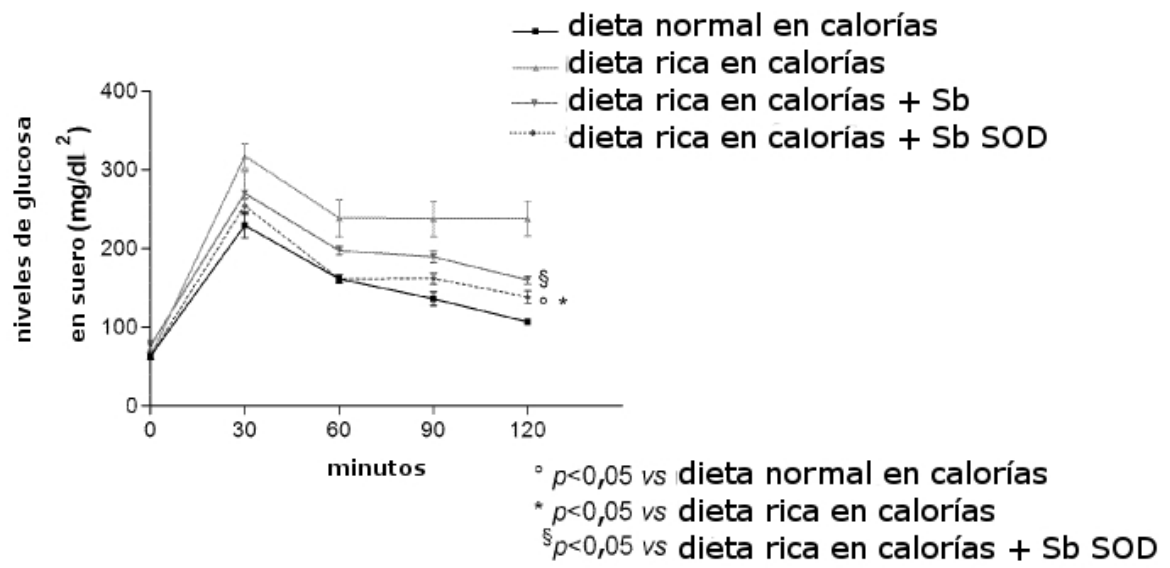


Figura 3b

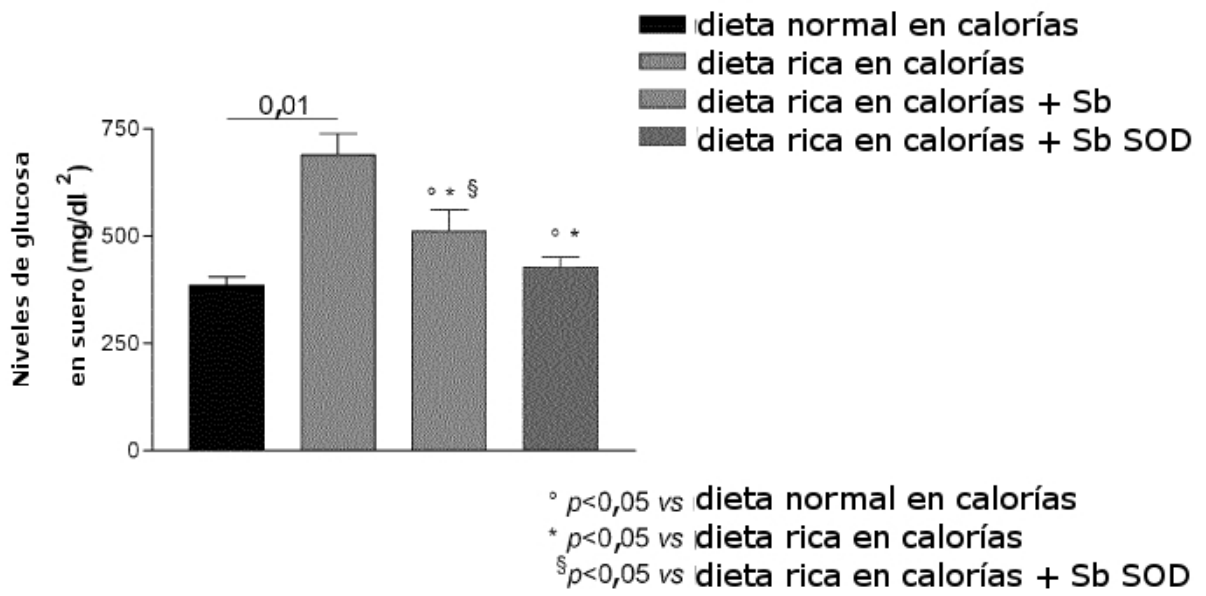


Figura 4

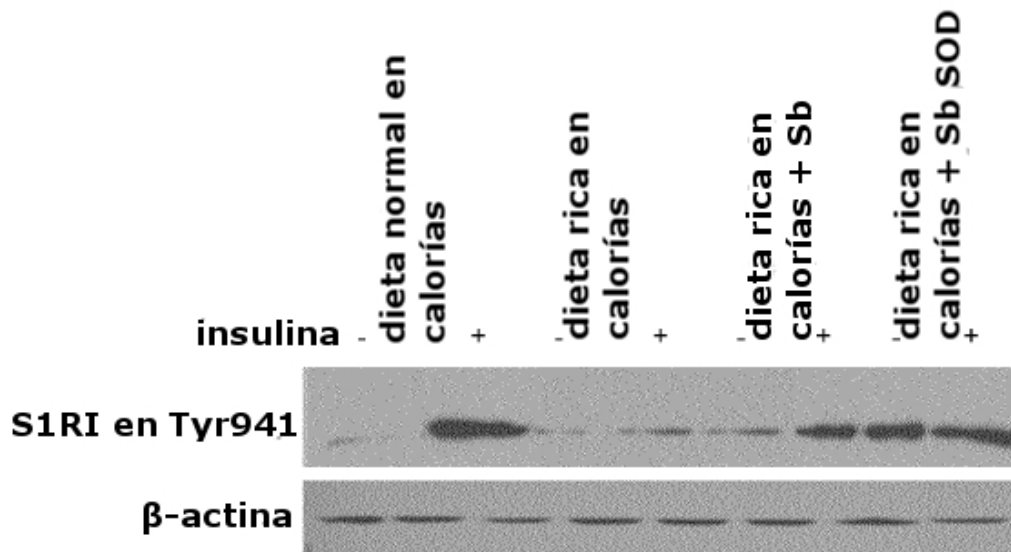


Figura 5

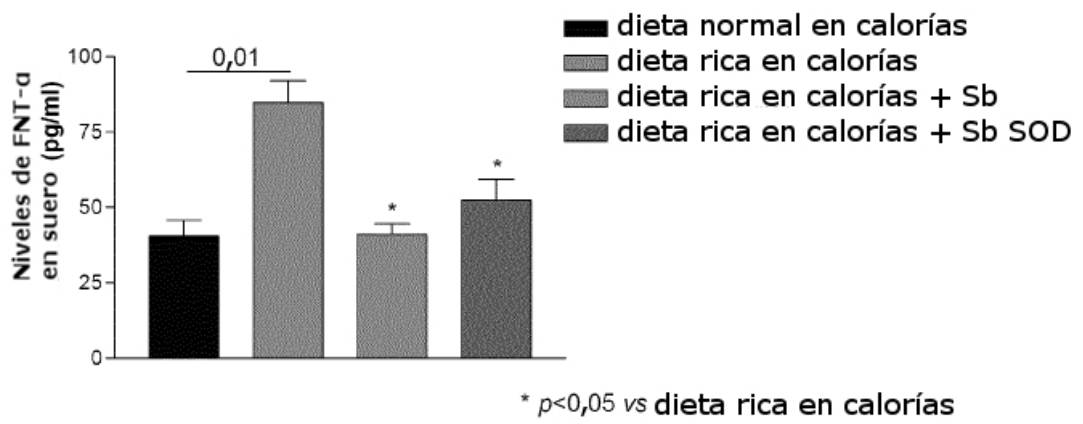
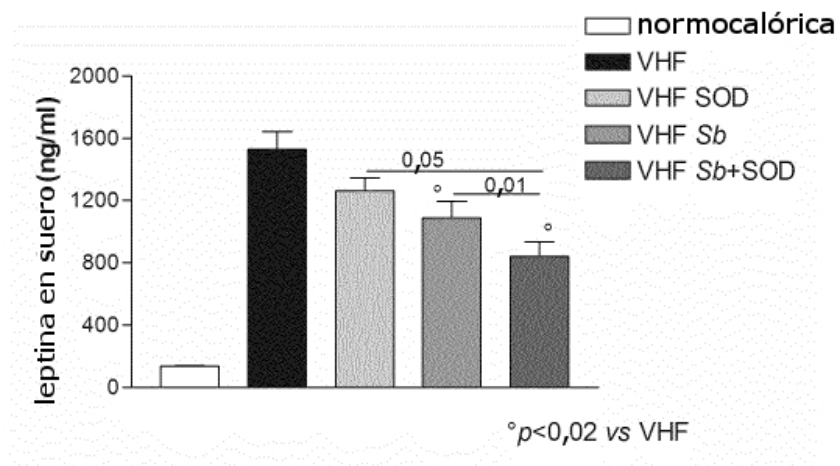


Figura 6



VHF Sb y VHF Sb + SOD $p < 0,02$ vs VHF: ANOVA unidireccional con prueba post de Bonferroni
 VHF SOD y VHF Sb vs VHF Sb + SOD: ANOVA unidireccional con prueba post de Newman-Keuls

Figura 7

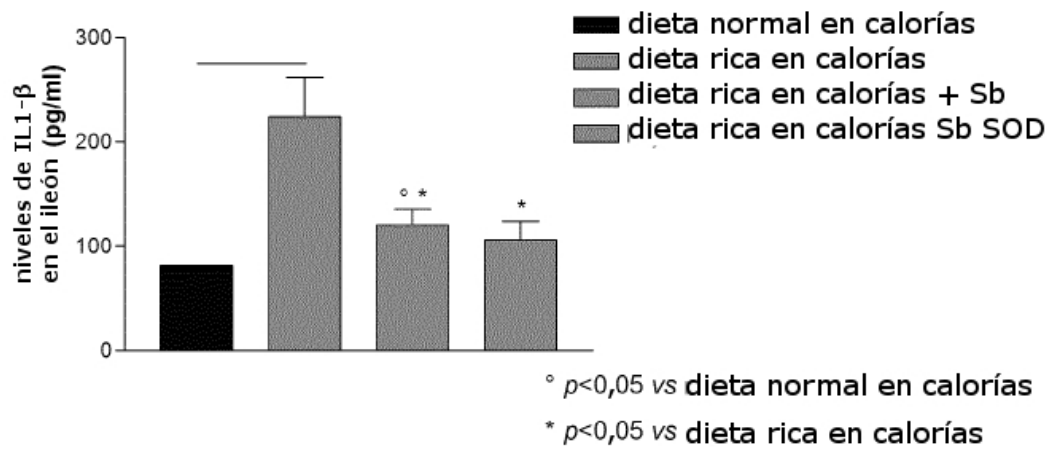


Figura 8

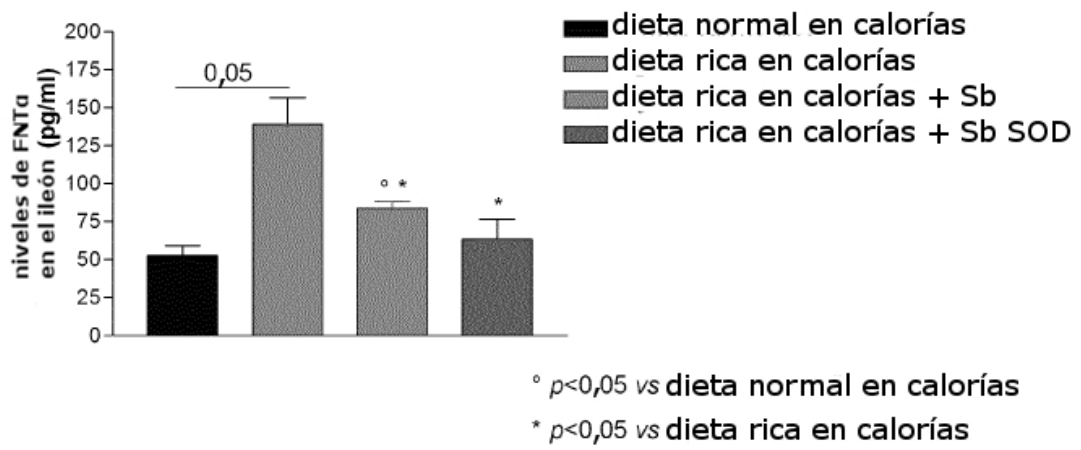


Figura 9

