

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 902**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/10** (2006.01)

**A23L 33/28** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61K 35/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10739348 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2461701**

54 Título: **Formulación alimenticia que comprende glucógeno**

30 Prioridad:

**03.08.2009 EP 09425315**

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

**23.06.2016**

73 Titular/es:

**AZIENDE CHIMICHE RIUNITE ANGELINI  
FRANCESCO A.C.R.A.F. S.P.A. (100.0%)  
Viale Amelia, 70  
00181 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**RUSSO, VINCENZO;  
LIBERATI, ELISA y  
BIONDI, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 574 902 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

Formulación alimenticia que comprende glucógeno

5 **Alcance de la invención**

La presente invención se refiere a la utilización de glucógeno en la preparación de una formulación alimenticia para la liberación controlada de glucosa.

10 En particular, la invención se refiere a la utilización de glucógeno que presenta un peso molecular promedio de entre 2.000.000 y 5.000.000 Daltons y un porcentaje de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-6 de entre 5% y 15%, con respecto al número total de enlaces, y que comprende menos de 1% en peso de azúcares reductores, en la preparación de una formulación alimenticia artificial para la liberación controlada de glucosa.

15 **Estado de la técnica**

Las formulaciones alimenticias artificiales que comprenden una fuente de glucosa son bien conocidas en la técnica.

20 Estas formulaciones pueden tener diversos campos de aplicación.

Un primer campo de aplicación se refiere a la utilización como suplementos dietéticos para atletas profesionales o aficionados.

25 Un segundo campo de aplicación se refiere a la utilización para la administración parenteral, cuando el individuo que requiere tratamiento no puede ser alimentado a través del tubo digestivo normal.

Un tercer campo de aplicación se refiere a la utilización para la alimentación entérica, en la forma de líquidos administrados a través de cánulas directamente al estómago o al intestino.

30 Un cuarto campo de aplicación se refiere a la utilización como agentes capaces de inducir una sensación de saciedad (agente de volumen) sin proporcionar una ingesta calórica significativa.

35 Las formulaciones alimenticias artificiales conocidas en la técnica se obtienen generalmente mediante la hidrólisis del almidón o sus derivados. El almidón es el polisacárido más difundido en el mundo de las plantas y comprende cadenas poliméricas de glucosa. El almidón comprende principalmente dos polímeros, amilosa (aproximadamente 20% en peso) y amilopectina (aproximadamente 80% en peso). La amilosa es un polímero lineal en el cual las unidades de glucosa están unidas conjuntamente mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4). La amilopectina es un polímero ramificado que tiene cadenas de base de una estructura similar a la amilosa en la cual las cadenas laterales están ramificadas a través de enlaces  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6) cada 24 a 30 unidades de glucosa.

40 Las solicitudes de patente EP 1548033 o US 2005/0159329 describen polisacáridos altamente ramificados obtenidos mediante la hidrólisis enzimática de almidón que tiene un peso molecular medio de entre 90.000 y 150.000 Daltons. En la solicitud de patente EP 1369432 también se describen polisacáridos similares que tienen un peso molecular medio de entre 3.500 y 20.000 Daltons.

45 La solicitud de patente EP 487187 describe una formulación alimenticia que comprende maltodextrinas con un bajo contenido calórico de entre 160 y 240 Kcal por 100 g. La solicitud de patente EP 514.528 describe un producto dietético soluble que comprende maltodextrinas y beta-glucanos y/o pentosanos.

50 Las maltodextrinas son una clase de sustancias derivadas de la hidrólisis de almidón que comprende algunas decenas de moléculas de glucosa unidas conjuntamente mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4). Dependiendo del grado en el cual se hidrolice el almidón, efectuado mediante medios químicos/físicos o enzimáticos o mediante una combinación de ambos, se obtienen diversos tipos de maltodextrinas, que se distinguen por el número de moléculas de glucosa que las constituyen, típicamente desde 2 hasta 20 unidades. El Equivalente de Dextrosa (DE), que puede ir desde un mínimo de 4 a 6 hasta un máximo de 36 a 39, se determina sobre la base de su longitud. Cuanto mayor es el valor de DE, mayor es el grado de hidrólisis y más corta es la longitud de cadena. El resultado final de su digestión por el cuerpo es siempre glucosa, pero la velocidad a la cual tiene lugar el proceso y la producción consiguiente de energía depende del valor de DE.

60 Las formulaciones alimenticias artificiales que comprenden una fuente de glucosa contienen otros elementos nutrientes esenciales, por ejemplo para restablecer el balance de agua/sal en las situaciones cuando se producen grandes cantidades de sudor, por ejemplo después de esfuerzo físico o actividad deportiva vigorosa.

65 La osmolaridad ideal de estas formulaciones debe tener un valor que es idéntico a o ligeramente menor que el del plasma (280-300 mOsm/kg), que es la solución de energía que debe ser hipotónica con la sangre, dado que la osmolaridad influye en la velocidad de vaciado gástrico y en particular la absorción intestinal de agua y moléculas

disueltas. Con las maltodextrinas es posible producir formulaciones isotónicas que comprenden otros elementos nutrientes además de una fuente de glucosa.

5 Las formulaciones alimenticias artificiales conocidas en la técnica, que comprenden polisacáridos de bajo peso molecular con enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , proporcionan un suministro rápido de glucosa la cual es absorbida y metabolizada rápidamente.

Esto tiene dos tipos importantes de desventajas.

10 La primera desventaja reside en que estas formulaciones alimenticias no pueden ser administradas a individuos diabéticos porque darían como resultado una elevación rápida del nivel de glucosa en sangre (glucemia).

15 La segunda desventaja reside en el hecho de que el efecto energético no es de larga duración a menos que se ingieran grandes cantidades de sustancias, lo cual daría como resultado fenómenos diarreicos debido al agua que es reclamada por el intestino como resultado de la osmolaridad excesiva de estas sustancias.

Las composiciones que tienen mayores pesos moleculares y enlaces que son más difíciles de hidrolizar han sido investigadas en un intento por superar estas desventajas.

20 La solicitud de patente WO 00/32064 describe una composición que comprende una mezcla de hidratos de carbono tales como almidón o derivados de almidón y polisacáridos reticulados, tales como derivados de celulosa, gomas, pectina y alginatos.

25 La solicitud de patente WO 2004/023891 describe una formulación alimenticia que comprende polisacáridos con enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ , típicamente dextrano, pululano y alternano, que tienen un peso molecular de entre 300.000 y 1.000.000 Daltons.

30 La solicitud de patente EP 153013 describe formulaciones con base en dextranos, polisacáridos con enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  que tienen un peso molecular entre 50.000 y 1.000.000 Daltons, con poca o ninguna absorción entérica, que son capaces de actuar como agentes capaces de inducir una sensación de saciedad (agentes de volumen).

35 Por lo tanto se sabe que las formulaciones alimenticias artificiales conocidas en la técnica, que comprenden polisacáridos con enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ , proporcionan una liberación gradual de glucosa, siempre que la longitud de cadena no sea tan larga, en cuyo caso la absorción se reduce drásticamente.

40 El glucógeno es un polisacárido de origen principalmente animal que comprende predominantemente moléculas de D-glucosa ligadas a través de enlaces glucosídicos  $\alpha-1-4$  con ramificaciones formadas mediante enlaces glucosídicos  $\alpha-1-6$  cada cinco a diez unidades de glucosa. El número y grado de ramificaciones del glucógeno varía de acuerdo con la especie animal de la cual se obtiene. El peso molecular del glucógeno natural es del orden de  $10^6$ - $10^7$  Daltons. En la naturaleza, el glucógeno está unido siempre a una proteína, glucogenina, una enzima relacionada con el proceso de síntesis de glucógeno celular.

45 La calidad de un derivado de glucógeno comercial deriva de la presencia de cantidades mayores o menores de residuos de proteína (medidos en términos de cantidades de nitrógeno expresadas como ppm) y azúcares reductores. La patente EP 654048 describe un derivado de glucógeno de alta calidad con un bajo contenido de nitrógeno y azúcares reductores y un peso molecular de aproximadamente 2.500.000 Daltons.

50 El glucógeno se usa como un emoliente (como se describe en JP-A-87-178.505) y un agente hidratante (como se describe en JP-A-88-290.809) en el sector de los cosméticos, como un aditivo en el sector alimentario y como un humectante y lubricante en disoluciones oftálmicas (como se describe en la patente WO 99/47120).

55 El documento WO 2008/081834 describe la utilización de glucógeno, preferentemente glucógeno sintetizado enzimáticamente (ESG), que tiene un peso molecular de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 millones Daltons que libera más de 60% de glucosa en menos de 5 horas, en una formulación alimenticia y administrada oralmente para proporcionar una disminución en el nivel de glucosa en sangre, una reducción de la producción/secreción de insulina, una mejora del entorno intestinal, especialmente la flora intestinal, una estimulación del movimiento intestinal, una reducción de la grasa corporal, especialmente la grasa visceral, un incremento en la proporción de colesterol HDL (conocido como colesterol bueno), una disminución en el colesterol malo (LDL), una disminución en el colesterol en sangre, y una disminución de la grasa neutra en sangre.

60 La formulación alimenticia artificial para la liberación controlada de glucosa de la presente invención, y la utilización de glucógeno para la preparación de la misma, no se describen ni se sugieren en el estado de la técnica.

**Sumario de la invención**

De manera sorprendente, el Solicitante ha encontrado que el glucógeno descrito en la patente EP 654048, y según la reivindicación 1, puede proporcionar una liberación gradual de glucosa similar a la obtenida a partir de otros polisacáridos de menor peso molecular, del tipo de maltodextrina, en un sistema *in vitro* que simula el tubo digestivo.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de glucógeno en la preparación de una formulación alimenticia artificial para la liberación controlada de glucosa.

El solicitante ha encontrado que, a pesar de su alto peso molecular, más de 2.000.000 Daltons, el glucógeno mencionado anteriormente experimenta degradación enzimática a través de las enzimas presentes en el tubo digestivo y permite que la glucosa se libere gradualmente durante un periodo de 20 a 24 horas, en un sistema *in vitro* el cual simula el tubo digestivo.

Además de esto, el Solicitante ha observado también que debido a que el glucógeno tiene un alto peso molecular, más de 2.000.000 Daltons, para la misma cantidad de glucosa ingerida, la osmolaridad en comparación con la administración de maltodextrinas es mucho menor, y esto evita los problemas de reclamo de agua con los efectos diarreicos conocidos en la técnica.

El solicitado ha advertido también que la liberación gradual y constante de glucosa observada durante el tránsito del glucógeno a través del tubo digestivo puede proporcionar de manera ventajosa la posibilidad de usar glucógeno dosificado adecuadamente como un alimento o bebida para individuos diabéticos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere también a una formulación alimenticia artificial para la liberación controlada de glucosa, que comprende glucógeno y al menos otro componente comestible, preferentemente por lo menos un elemento nutricional.

El solicitante ha descubierto que la formulación alimenticia artificial de acuerdo con la invención tiene mejor sabor que una formulación conocida en la técnica que contiene maltodextrinas.

En particular, el solicitante ha observado que la formulación alimenticia artificial de acuerdo con la invención sabe menos dulce, lo que es más agradable y bien tolerado por el paladar.

De manera ventajosa, la formulación alimenticia artificial de acuerdo con esta invención comprende al menos un elemento nutriente seleccionado del grupo que comprende hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos y derivados, lípidos, fosfolípidos, vitaminas y sales minerales.

En un aspecto más, la presente invención se refiere también a una formulación acuosa para la administración entérica o parenteral de glucosa, que comprende glucógeno y al menos un excipiente adicional farmacéuticamente aceptable.

El solicitante ha descubierto que la baja osmolaridad de las disoluciones de glucógeno hace posible preparar formulaciones acuosas isotónicas (300 mOsm/kg) que tienen un alto contenido de glucosa, mayor que el contenido de glucosa de disoluciones conocidas que contienen azúcares o polisacáridos de bajo peso molecular.

El solicitante ha descubierto también que, a diferencia de otros polisacáridos con liberación lenta de glucosa, las disoluciones de glucógeno antes descritas tienen valores de pH cercanos a los valores fisiológicos aún con altas concentraciones de polisacáridos.

**Descripción detallada de la invención**

En particular, la presente invención se refiere a la utilización de glucógeno según la reivindicación 1 en la preparación de una formulación alimenticia artificial para la liberación controlada de glucosa.

El glucógeno usado en la presente invención se obtiene a partir del glucógeno natural que puede extraerse de animales u hongos.

Los moluscos, en particular mejillones (*Mytilus edulis* y *Mytilus gallus provincialis*), son una fuente particularmente útil de glucógeno porque están disponibles en grandes cantidades a bajo coste y contienen una cierta cantidad de glucógeno (en promedio entre 2,5% y 3,9% en peso). Otras fuentes naturales de glucógeno incluyen otros moluscos bivalvos tales como almejas, ostras, algunas especies de gastrópodos o caracoles marinos, tales como lapa zapatilla (*Crepidula fornicata*), y los órganos de animales vertebrados los cuales son ricos en glucógeno, tal como el hígado y los músculos.

El glucógeno usado en la presente invención tiene un peso molecular entre 2.000.000 y 5.000.000 Daltons.

El glucógeno usado en esta invención tiene un porcentaje de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-6 entre 5% y 15%, de preferencia entre 8% y 12%, en relación con el número total de enlaces.

5 El glucógeno usado en la presente invención se puede usar como se obtiene de los procesos de extracción, o se puede tratar en procedimientos de purificación subsiguientes.

10 Como ya se mencionó anteriormente, la calidad de un derivado comercial de glucógeno deriva de la presencia de una cantidad mayor o menor de residuos de proteína (medidos en términos de cantidades de nitrógeno expresadas en ppm) y azúcares reductores.

En el contexto de la presente invención, se prefiere usar un derivado de glucógeno que tiene un bajo contenido de azúcares reductores y nitrógeno. Los ejemplos de productos comerciales usados preferentemente en la presente invención son derivados de glucógeno producidos y distribuidos por Sigma-Aldrich.

15 El derivado de glucógeno usado en la presente invención comprende menos de 1% en peso, preferiblemente menos de 0,25% en peso de azúcares reductores, medidos usando el método de F. D. Snell y Snell, "Colorimetric Methods of Analysis", Nueva York, 1954, Vol. III, p. 204).

20 Preferentemente, el derivado de glucógeno usado en la presente invención comprende menos de 3.000 ppm de nitrógeno, más preferentemente menos de 1.000, y aún más preferentemente menos de 100 ppm de nitrógeno, medido de acuerdo con el método de Kjeldahl.

25 Preferentemente, el derivado de glucógeno usado en la presente invención, es glucógeno Polglumyt™, la marca registrada de un glucógeno desproteínizado que tiene un bajo contenido de azúcares reductores, producido y distribuido por A.C.R.A.F. S.p.A. Roma, Italia, y obtenido de acuerdo con el procedimiento de purificación descrito en la patente EP 654048B1.

30 El derivado de glucógeno usado en la presente invención tiene un peso molecular de entre 2.000.000 y 5.000.000 Daltons, y un porcentaje de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-6 de entre 5% y 15%, preferentemente entre 8% y 12%, con respecto al número total de enlaces. La formulación alimenticia para la liberación controlada de glucosa de acuerdo con la presente invención comprende glucógeno y al menos otro componente comestible, preferentemente al menos un elemento nutriente.

35 De manera ventajosa, la formulación alimenticia de acuerdo con la presente invención comprende al menos un elemento nutriente seleccionado del grupo que comprende hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos y derivados, lípidos, fosfolípidos, vitaminas y sales minerales.

40 Preferentemente, la ingesta de hidratos de carbono en la formulación alimenticia de acuerdo con la presente invención se satisface por la presencia de glucógeno. Sin embargo, la formulación alimenticia de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente otros tipos de hidratos de carbono además del glucógeno.

45 Las proteínas usadas en la formulación alimenticia de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse de diferentes fuentes naturales, tales como por ejemplo proteínas de leche, proteínas de huevo o proteínas de la sangre. Las proteínas pueden estar presentes también en una forma hidrolizada de péptidos o aminoácidos individuales. Preferentemente, al menos la mitad del contenido de proteínas está representada por proteínas intactas.

50 Los lípidos usados en la formulación alimenticia de acuerdo con la presente invención pueden ser triglicéridos de ácidos grasos saturados e insaturados que contienen 12 a 18 átomos de carbono. Preferentemente, se usan triglicéridos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tales como por ejemplo ácidos grasos  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9. Se prefieren particularmente triglicéridos de ácido oleico, ácido linoleico (LA), ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido araquidónico, ácido eicosapentenoico (EPA), ácido docosahexenoico (DHA) y ácido docosapentenoico (DPA). Los fosfolípidos pueden ser preferentemente lecitina o sus equivalentes. La lecitina puede ser de origen animal o vegetal, y comprende predominantemente ácido fosfórico, colina, ácidos grasos, glicerol, glucolípidos, triglicéridos y fosfolípidos tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol.

60 Las vitaminas usadas en la formulación alimenticia de acuerdo con la presente invención no están limitadas particularmente, y pueden ser cualesquiera de las vitaminas conocidas tales como, por ejemplo, vitaminas solubles en agua en grupos B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 y B12) y C, o vitaminas liposolubles en grupos A, D, E y K. También se pueden usar pseudovitaminas tales como colina, ácido antranílico, ácido lipoico, bioflavonoides, ubiquinonas y metilmetionina. El contenido de vitaminas de una formulación se expresa generalmente como un porcentaje de la cantidad diaria recomendada o % de CDR.

65 Las sales minerales se clasifican generalmente sobre la base de la necesidad diaria como macroelementos (más de 100 mg), microelementos (1 y 100 mg) y oligoelementos (menos de 1 mg). Los macroelementos son sales que comprenden calcio, cloro, fósforo, magnesio, potasio, sodio y/o azufre. Los microelementos son sales que

comprenden cobre, cinc, flúor, yodo, selenio, cromo, cobalto, manganeso, molibdeno, silicio, níquel, vanadio. Los oligoelementos son sales que comprenden estaño, níquel, germanio, vanadio y volframio.

5 La formulación alimenticia puede estar en forma de un alimento completo, un suplemento alimenticio, una disolución nutricional para administración gastroentérica, por ejemplo para alimentación entérica administrada a través de un tubo nasogástrico y nasoentérico, una disolución nutricional para administración parenteral, o un alimento o suplemento para individuos diabéticos.

10 Un alimento completo comprende todas las sustancias nutricionales necesarias para satisfacer las necesidades diarias del usuario en términos de la ingesta de sustancias y energía. Así, la formulación debe contener hidratos de carbono, incluyendo glucógeno, en una cantidad de entre 30% y 70% en peso, proteínas en una cantidad entre 10% y 30% en peso y lípidos entre 20% y 40% en peso.

15 Además de esto, la formulación debe poder proporcionar entre 2000 y 2900 Kcal por día, y puede estar en forma de un sólido, para disolución o dispersión en agua u otra bebida, o un líquido, en una forma que está lista para uso o como un concentrado. La menor o mayor ingesta de energía puede proporcionarse para situaciones particulares (regímenes dietéticos o deportivos).

20 Un suplemento alimenticio contiene solamente algunas de las sustancias nutricionales requeridas para satisfacer las necesidades diarias del usuario en términos de ingesta de proteínas y de energía. Así, la formulación podrá proporcionar menos de 1500 Kcal, de preferencia de 100 a 1000 Kcal por día. Otra vez, en este caso, la formulación puede estar en forma sólida o líquida como se describió antes, para adición a la dieta normal o como un componente de la dieta normal.

25 La formulación alimenticia de acuerdo con la presente invención puede contener además aditivos alimentarios convencionales para mejorar su aspecto, agradabilidad y conservación, tales como por ejemplo agentes colorantes, conservantes, antioxidantes, reguladores de acidez, espesantes, estabilizadores, emulsionantes, mejoradores de sabor, saborizantes, humectantes y edulcorantes.

30 Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención sin, no obstante, limitarla.

### Ejemplo 1

35 Se preparó en el laboratorio un modelo que simula el sistema digestivo que consiste en una primera etapa de incubación con alfa-amilasa salival, una segunda fase de incubación con pepsina y una tercera etapa de incubación con pancreatina, amiloglucosidasa y bilis bovina a un pH de aproximadamente 7.

40 Se disolvieron 6 g de sustrato en botellas Pyrex de 250 ml provistas con tapas de rosca, en 100 ml de amortiguador de fosfato.

La temperatura de la disolución se elevó hasta 37°C y después se añadió 0,1 ml de una disolución de alfa-amilasa humana (disolución A). La disolución resultante se incubó durante 15 minutos en un baño termostatzado a 37°C, con agitación magnética.

45 La disolución se ajustó a pH = 2 con 2,50 ml de una disolución 1 M de HCl, y después se añadieron 0,25 ml de una suspensión de pepsina Sigma P7012 en disolución de NaCl (disolución B). La disolución resultante se incubó durante 30 minutos a 37°C, nuevamente con agitación magnética.

50 La disolución se ajustó a pH = 6,9 con 8,67 ml de una disolución 1 M de NaHCO<sub>3</sub>, y después se añadieron 2 ml de una disolución de pancreatina y amiloglucosidasa en CaCl<sub>2</sub> 25 mM (disolución C) y 2,4 g de bilis bovina-ovina (Sigma B8381). La disolución resultante se incubó durante 5 minutos a 37°C, con agitación.

55 La disolución se transfirió a tubos de diálisis (ésteres de celulosa mezclados, corte 3500) los cuales se colocaron en contenedores de 1000 ml de un aparato de disolución USP XIII que contiene aproximadamente 900 ml de una disolución de amortiguador a una temperatura de 37°C, preparada como se expone a continuación.

60 Se mezclaron 800 ml de amortiguador de fosfato y 0,8 ml de una disolución 1 mM de CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O. Se ajustó después a pH 2 con 20 ml de HCl 1 M, se añadieron 2 ml de una disolución de NaCl (9 g/l), el pH se ajustó a 6,9 con 70 ml de una disolución 1 M de NaHCO<sub>3</sub> y se añadieron 16 ml de una disolución de CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 25 mM. Durante un periodo de 24 horas se tomaron muestras de 1 ml de la disolución de amortiguador en los momentos indicados en las Tablas 2 a 5.

65 El ensayo se llevó a cabo por duplicado usando glucógeno Polglumyt™ y Maltodextrina DE 16,5-19,5 como sustrato. La muestra de 6 g de glucógeno Polglumyt™ es equivalente a 5,220 g de glucosa, mientras que la muestra de 6 g de Maltodextrina DE 16,5-19,5 es equivalente a 5,748 g de glucosa.

## ES 2 574 902 T3

El amortiguador de fosfato y las disoluciones A, B y C tienen las composiciones de la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Amortiguador de fosfato	20 mM, pH = 6,9, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,42 g/l, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,36 g/l, NaCl 0,58 g/l
Disolución A	Alfa-amilasa humana Sigma A1031, 10 mg/ml en CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O 1 mM
Disolución B	Pepsina Sigma P7012 procedente de mucosa gástrica porcina, 1 mg/ml en una disolución de NaCl 9 g/l
Disolución C	Pancreatina Sigma P7545, 0,5 mg/ml, amiloglucosidasa Sigma A9228 (procedente de Rhizopus SP) 840 U/ml en una disolución de CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O 25 mM

5 Las muestras se analizaron para determinar la cantidad de glucosa liberada, usando dos kits comerciales: Sigma GAGO20 Glucose (GO) Assay Kit y Sigma GAHK20 Glucose (HK) Assay Kit (ambos suministrados por Sigma-Aldrich Co.).

10 El primer ensayo se basa en la oxidación de D-glucosa a ácido D-glucónico y peróxido de hidrógeno por medio de glucosa-oxidasa. El peróxido de hidrógeno liberado reacciona con la o-dianisidina en presencia de una peroxidasa para formar un producto de oxidación marrón el cual en presencia de ácido sulfúrico da un producto de oxidación de un color rosa. La intensidad del color medida a 540 nm es proporcional a la concentración de glucosa.

15 Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 2 a 5 a continuación.

TABLA 2

Maltodextrina DE 16,5-19,5 - Ensayo 1		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,81	14
3	1,52	27
4	1,99	35
6	2,58	46
20	3,85	68
21	3,96	70
24	4,02	71

20

TABLA 3

Maltodextrina DE 16,5-19,5 - Ensayo 2		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,89	16
3	1,79	32
4	2,28	40
6	2,96	53
20	4,22	75
21	4,08	73
24	4,10	73

TABLA 4

Glucógeno Polglumyt™ - Ensayo 1		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,74	14
3	1,16	23
4	1,90	37
6	2,57	50
20	4,12	80
21	4,14	81
24	4,12	81

25

TABLA 5

Glucógeno Polglumyt™ - Ensayo 2		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,82	16
3	1,23	24
4	2,08	41
6	2,43	47
20	4,14	81
21	4,05	79
24	4,01	78

El segundo ensayo se basa en la fosforilación de la glucosa en presencia de ATP por medio de una hexocinasa. Glucosa-6-fosfato se oxida subsiguientemente a 6-fosfogluconato en presencia de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), una reacción catalizada mediante glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En el transcurso de la oxidación, una cantidad equimolar de NAD se reduce a NADH. El incremento consiguiente en absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

5

10 Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 6 a 9 a continuación.

TABLA 6

Maltodextrina DE 16,5-19,5 - Ensayo 1		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,96	17
3	1,60	28
4	2,21	39
6	2,73	49
20	4,09	73

15

TABLA 7

Maltodextrina DE 16,5-19,5 - Ensayo 2		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,89	16
3	1,82	32
4	2,30	41
6	3,04	54
20	4,49	80

TABLA 8

Glucógeno Polglumyt™ - Ensayo 1		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,83	16
3	1,44	28
4	2,03	40
6	2,75	54
20	4,07	80
24	4,14	81

20

TABLA 9

Glucógeno Polglumyt™ - Ensayo 2		
Horas	mg/ml de glucosa	% de glucosa liberada
0	0,00	0
2	0,83	16
3	1,44	28
4	2,03	40
6	2,75	54
20	4,07	80

**Ejemplo 2**

5 Se prepararon seis disoluciones de glucógeno Polglumyt™ y Maltodextrina DE 16,5-19,5 en agua destilada, en concentraciones crecientes (10, 14, 18, 22, 26 y 30% en peso).

10 Las disoluciones resultantes se analizaron para determinar la viscosidad, el pH, la conductividad y la osmolaridad. Los resultados se resumen en las Tablas 10 y 11 a continuación, junto con tiempo de disolución. Se realizaron mediciones de viscosidad usando un reómetro Bohlin Gemini 150 equipado con geometría de cono-plato de 2°/55 mm. Se realizaron medidas de osmolaridad usando un osmómetro de Knauer. Antes del análisis, las disoluciones se filtraron usando un filtro Millipore de 0,2 µm.

TABLA 10

Glucógeno Polglumyt™					
Concentración (% p/p)	Tiempo de disolución (min)	Viscosidad (mPa)	pH	Conductividad (µS/cm)	Osmolaridad (mOsm/kg)
10	15	2,3	6,76	92,4	-2,00
14	20	2,7	7,15	98,7	-2,66
18	30	3,8	7,34	113,7	1,00
22	45	4,0	7,47	129,7	0,50
26	60	6,0	8,22	142,3	5,66
30	60	19,1	8,34	151,2	6,33

15

TABLA 11

Maltodextrina DE 16,5-19,5					
Concentración (% p/p)	Tiempo de disolución (min)	Viscosidad (mPa)	pH	Conductividad (µS/cm)	Osmolaridad (mOsm/kg)
10	1	1,96	5,41	560	110,30
14	1	2,15	4,65	707	152,00
18	1	2,33	4,56	792	193,30
22	1,5	2,71	4,22	850	236,00
26	2	2,98	4,46	916	290,66
30	2	3,53	4,41	937	335,00

**Ejemplo 3**

20 Las siguientes Tablas 12, 13 y 14 ilustran ejemplos de composiciones alimenticias artificiales que comprenden glucógeno de acuerdo con la presente invención. La Tabla 12 ilustra una formulación alimenticia para individuos normales, la Tabla 13 para individuos diabéticos, y la Tabla 14 para administración vía tubo gastro-entérico.

25

TABLA 12

Ingredientes		F1	F2	F3
Glucógeno Polglumyt™	g	15	30	15
Dextrosa	g	5	10	5
Proteínas	g	20	10	
Bcaa	g	3		1,5
Éster etílico de creatina	g			3
Arginina	g			2
Ornitina	g			1
Citrulina	g			0,25
Glutamina	g	3	2	
Tirosina	g			0,5
Taurina	g	0,5		0,5
Magnesio	mg		25	
Sodio	mg		345	
Potasio	mg		145	
Cloruros	mg		130	
Ácido alfa-lipoico	mg	200		
Cafeína	mg			60
Tribulus Terrestris Ex	mg			300
Glucosamina	mg	200	200	

Ingredientes		F1	F2	F3
Curcuma Longa Ex	mg	100		
Vitamina B1	%CDR	50%	50%	50%
Vitamina B2	%CDR	50%	50%	50%
Vitamina B5	%CDR	50%	50%	50%
Vitamina B6	%CDR	50%	50%	50%
Vitamina B12	%CDR	50%	50%	50%
Vitamina A	%CDR	50%	50%	50%
Vitamina C	%CDR	200%	200%	100%
Vitamina E	%CDR	200%	200%	100%

CDR: Cantidad Diaria Recomendada  
 Polglumyt™: glucógeno desproteínizado que tiene un contenido reducido de azúcares reductores, producido y distribuido por A.C.R.A.F. S.p.A., Roma, Italia.

TABLA 13

Ingredientes		F4
Glucógeno Polglumyt™	g	12
Fructosa	g	1
Proteínas	g	4
Lípidos vegetales	g	3,7
Fibra dietética	g	1,5
Vitaminas	g	100% CDR
Sales minerales	mg	600

5

TABLA 14

Ingredientes		F5
Glucógeno Polglumyt™	g	15
Dextrosa	g	5
Proteínas	g	6
Lípidos vegetales	g	6
Fibra dietética	g	2
Vitaminas	g	100% CDR
Sales minerales	mg	600

**Ejemplo 4**

10 La Tabla 15 a continuación ilustra una composición de ejemplo para administración parenteral, que comprende glucógeno de acuerdo con la presente invención.

TABLA 15

Principios activos	Cantidades por 100 ml
Glucógeno Polglumyt™	6 g
Dextrosa	1 g
Aceite de soja purificado	3,5 g
Alanina	0,33 g
Arginina	0,23 g
Ácido aspártico	0,07 g
Ácido glutámico	0,11 g
Glicina	0,16 g
Histidina	0,14 g
Isoleucina	0,11 g
Leucina	0,16 g
Lisina	0,18 g
Metionina	0,11 g
Fenilalanina	0,11 g
Prolina	0,14 g
Serina	0,09 g
Treonina	0,11 g
Triptófano	0,04 g
Tirosina	0,004 g

Valina	0,15 g
Cloruro de calcio	0,01 g
Sulfato de magnesio	0,03 g
Cloruro de potasio	0,12 g
Acetato de sodio	0,1 g

**Ejemplo 5**

5 La Tabla 16 a continuación ilustra una composición de ejemplo en polvo para disolución en 100 ml de agua para preparaciones inyectables que comprenden glucógeno de acuerdo con la presente invención.

TABLA 16

Principios activos	Cantidades por 100 ml
Glucógeno Polglumyt™	6 g
Dextrosa	1 g
Alanina	0,77 g
Arginina	0,61 g
Glicina	0,92 g
Histidina	0,25 g
Isoleucina	0,92 g
Leucina	1,13 g
Lisina	0,62 g
Metionina	0,10 g
Fenilalanina	0,10 g
Prolina	0,82 g
Serina	0,51 g
Treonina	0,46 g
Triptófano	0,08 g
Valina	0,86 g

**Ejemplo 6**

10 La Tabla 17 a continuación muestra valores de osmolaridad para disoluciones al 5% de glucosa, maltodextrina (DE 16,5-19,5) y glucógeno Polglumyt™.

15

TABLA 17

Hidrato de carbono	Cantidad g/100 ml	Osmolaridad mOsm/kg	Unidades en mOsm/kg disponibles para otros componentes
Glucosa	5	280	~20
Maltodextrina	5	55	~245
Glucógeno Polglumyt™	5	< 1	~300

20 Los resultados ilustrados en la Tabla 17 muestran claramente que una formulación que contiene aproximadamente 5% de D-glucosa ya es una disolución iso-osmótica, una disolución al 5% de maltodextrina (DE 16,5-19,5) tiene una osmolaridad de 55 mOsm/kg (aproximadamente 1/5 en comparación con glucosa), mientras que una disolución al 5% de glucógeno Polglumyt™ tiene un valor de osmolaridad menor que 1 mOsm/kg (aproximadamente 300 veces menos que la glucosa).

25 Así, como se ilustra en la Tabla 17, una formulación que contiene glucógeno Polglumyt™ permite preparar formulaciones que tienen un mayor contenido de glucosa y/o un mayor contenido de componentes nutrientes esenciales (por ejemplo vitaminas, aminoácidos, sales minerales, etc.).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Formulaci3n alimenticia artificial para su utilizaci3n en la liberaci3n controlada de glucosa que comprende gluc3geno y por lo menos otro componente comestible, caracterizada por que dicho gluc3geno presenta un peso molecular entre 2.000.000 y 5.000.000 Daltons, y un porcentaje de enlaces glucos3dicos  $\alpha$ -1-6 de entre 5% y 15%, con respecto al n3mero total de enlaces, y comprende menos de 1% en peso de az3cares reductores, y en la que dicha liberaci3n controlada de glucosa es tal que (i) aproximadamente 50% de glucosa se libera en no menos de 5 horas y (ii) aproximadamente 80% de glucosa se libera en no menos de 12 horas.
- 10 2. Formulaci3n alimenticia seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada por que dicho gluc3geno presenta un peso molecular de aproximadamente 2.500.000 Daltons.
- 15 3. Formulaci3n alimenticia seg3n la reivindicaci3n 1 o 2, caracterizada por que dicho gluc3geno presenta un porcentaje de enlaces glucos3dicos  $\alpha$ -1-6 entre 8% y 12% con respecto al n3mero total de enlaces.
- 20 4. Formulaci3n alimenticia seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho gluc3geno comprende menos de 0,25% en peso de az3cares reductores.
- 25 5. Formulaci3n alimenticia seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho gluc3geno comprende menos de 3.000 ppm de nitr3geno, preferentemente menos de 1.000 ppm de nitr3geno.
- 30 6. Formulaci3n alimenticia seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicho componente comestible es un elemento nutricional.
- 35 7. Formulaci3n alimenticia seg3n la reivindicaci3n 6, caracterizada por que dicho elemento nutricional se selecciona de entre el grupo que comprende hidratos de carbono, prote3nas, amino3cidos y derivados, l3pidos, fosfol3pidos, vitaminas y sales minerales.
- 40 8. Formulaci3n alimenticia seg3n la reivindicaci3n 6, caracterizada por que dicha formulaci3n comprende hidratos de carbono, incluyendo dicho gluc3geno, en una cantidad de entre 30% y 70% en peso, prote3nas en una cantidad de entre 10% y 30% en peso, y l3pidos en una cantidad de entre 20% y 40% en peso.
- 45 9. Formulaci3n alimenticia seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha formulaci3n se encuentra en forma s3lida o en disoluci3n acuosa.
- 50 10. Formulaci3n alimenticia seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que dicha formulaci3n alimenticia se selecciona de entre el grupo que comprende un alimento completo, un suplemento alimenticio, una disoluci3n nutricional para administraci3n gastroent3rica, una disoluci3n nutricional para administraci3n parenteral, o un alimento o suplemento para los individuos diab3ticos.
- 55 11. Utilizaci3n de gluc3geno en la preparaci3n de una formulaci3n alimenticia para la liberaci3n controlada de glucosa, en la que dicho gluc3geno presenta un peso molecular entre 2.000.000 y 5.000.000 Daltons, y un porcentaje de enlaces glucos3dicos  $\alpha$ -1-6 de entre 5% y 15%, con respecto al n3mero total de enlaces, y comprende menos de 1% en peso de az3cares reductores, y en la que dicha liberaci3n controlada de glucosa es tal que (i) aproximadamente 50% de glucosa se libera en no menos de 5 horas y (ii) aproximadamente 80% de glucosa se libera en no menos de 12 horas.
12. Utilizaci3n de gluc3geno seg3n la reivindicaci3n 11, caracterizada por que dicho gluc3geno presenta las caracter3sticas de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
13. Utilizaci3n de gluc3geno seg3n la reivindicaci3n 11 o 12, caracterizada por que dicha formulaci3n alimenticia se encuentra en forma s3lida o en disoluci3n acuosa.
14. Utilizaci3n de gluc3geno seg3n cualquiera de las reivindicaciones anteriores 11 a 13, caracterizada por que dicha formulaci3n alimenticia se selecciona de entre el grupo que comprende un alimento completo, un suplemento alimenticio, una disoluci3n nutricional para la administraci3n gastroent3rica, una disoluci3n nutricional para la administraci3n parenteral, o un alimento o suplemento para los individuos diab3ticos.