

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 244**

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: **25.07.2008** **E 08786472 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2170359**

54 Título: **Utilización de cortezas de levadura para el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia**

30 Prioridad:

25.07.2007 FR 0756731

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

13.10.2016

73 Titular/es:

LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)

41, RUE ETIENNE MARCEL

75001 PARIS, FR

72 Inventor/es:

LAVILLE, MARTINE;

NAZARE, JULIE-ANNE y

ORIOLE, ERIC

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 586 244 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

Utilización de cortezas de levadura para el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia

La presente invención se refiere a la utilización de cortezas de levadura para el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia.

5 La insulina es una hormona hipoglucemiante secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina permite reducir la glucemia, en particular activando el transporte de glucosa en los tejidos objetivo (tejidos musculares, hepáticos y adiposos).

La diabetes de tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina que se traduce en una primera fase por una hiperinsulinia. Ciertas obesidades también están asociadas a una hiperinsulinia. En el caso de diabetes con
10 resistencia a la insulina, pueden prescribirse medicamentos que permiten reducir el exceso de azúcar en la sangre sin estimular la secreción de insulina (por ejemplo, la metformina).

El documento de patente JP-A-61-167622 propone un agente antidiabético a base de una fracción celular de levadura de cerveza, denominada pared celular en este documento, y se obtiene por hidrólisis de levadura de
15 cerveza desamargada durante al menos 2 horas a una temperatura de 50 a 70°C, y extracción acuosa de los constituyentes hidrosolubles. Dicha fracción celular de levadura de cerveza presenta especialmente un contenido en glucanos de aproximadamente 14,8%, un contenido en mananos de aproximadamente 13,9%. Dicha fracción celular presenta igualmente un contenido en glucógeno de aproximadamente 24,9%. El glucógeno es un polisacárido de reserva presente igualmente en los músculos, y en particular en el hígado. Este glucógeno es igualmente una
20 sustancia de reserva de la levadura, utilizada por ésta como fuente de energía para su supervivencia. Mientras que es uno de los componentes principales de la fracción celular descrita en esta solicitud japonesa, no forma parte de la pared celular de las levaduras.

La solicitud de patente WO 2005/021015 describe la utilización de cortezas de levadura para la prevención y el tratamiento de la hiperglucemia y para la estabilización de la glucemia, presentando dichas cortezas de levadura un
25 bajo contenido en glucógeno, y pudiéndose obtener mediante un procedimiento de autólisis o de hidrólisis enzimática simple. El contenido total de glucanos y mananos en dichas cortezas de levadura es de al menos 34,0% en peso sobre materia seca.

Los β -glucanos de la pared celular de la levadura son esencialmente polímeros de glucosa en los que las unidades de glucosa de la cadena principal están conectadas por enlaces β -1,3 y en los que las ramificaciones están conectadas por enlaces β -1,6. Los β -glucanos de levadura son insolubles y presentan una baja viscosidad.

30 Los β -glucanos purificados a partir de la pared celular de levadura poseen propiedades de inmunoestimulación. En particular, se ha mostrado que los β -glucanos de levadura son capaces de unirse a los macrófagos y de activarlos. Se estudian los β -glucanos de levadura para aplicaciones antibacterianas, antivirales y antitumorales (Adams, D.S., Journal of Leukocyte Biology, 1997).

La presente invención tiene por objeto la utilización de cortezas de levadura como agente regulador de insulina.

35 Un objeto de la invención es especialmente la utilización de cortezas de levadura en el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia.

La presente invención tiene por objeto la utilización de cortezas de levadura para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia, teniendo dichas cortezas de levadura:

- un contenido total de glucanos y mananos de al menos 34,0% en peso sobre materia seca, y
- 40 - un contenido en glucógeno inferior a 10,0% en peso sobre materia seca.

La expresión "corteza de levadura" se refiere a la fracción insoluble de células de levadura, no enriquecidas en cromo, obtenida después de una autólisis o una hidrólisis enzimática, esencialmente por proteasas, conduciendo a la solubilización de al menos 50%, y preferiblemente de al menos 60% en peso de materia seca de células de levadura enteras, y conservando los polisacáridos de estructura de la pared celular, es decir, los β -glucanos y los
45 mananos, estando estos mananos en forma de manoproteínas.

Esta autólisis o hidrólisis enzimática se lleva a cabo a fin de solubilizar la mayor parte de los azúcares de reserva de la célula de levadura, que son el glucógeno y la trehalosa. Las cortezas de levadura se obtienen por separación de la fracción solubilizada, por autólisis o hidrólisis enzimática, teniendo ésta una duración preferiblemente de al menos 18 horas. Los procedimientos preferidos de autólisis de las cremas de levadura se describen en las páginas de 370
50 a 377 en la obra de referencia "Yeast Technology", 2ª edición, 1991, G. Reed y T. W. Nogodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, New York, ISBN 0-442-31892-8. Las cortezas de levadura obtenidas de esta manera se secan después típicamente mediante un procedimiento clásico de secado, como el secado por atomización o el secado sobre rodillos calientes.

Las cortezas de levadura conforme a la invención presentan un contenido total en glucanos y mananos de la pared celular (expresado sistemáticamente en masa equivalente de glucosa y manosa respectivamente – véanse los métodos de medida de más adelante) de al menos 34,0% en peso sobre materia seca, así como un contenido en glucógeno (expresado sistemáticamente en masa equivalente de glucosa – véanse los métodos de medida de más adelante) inferior a 10,0% en peso sobre materia seca.

Por “hiperinsulinemia”, se indica en la presente memoria a la vez una hiperinsulinemia basal y una hiperinsulinemia postprandial. En un modo de realización ventajoso, las cortezas de levadura conforme a la invención se utilizan para la prevención y/o el tratamiento de la hiperinsulinemia postprandial. Alternativamente, las cortezas de levadura conforme a la invención se utilizan para la prevención y/o el tratamiento de la hiperinsulinemia basal. En aún otro modo de realización, las cortezas de levadura conforme a la invención se utilizan para la prevención y/o el tratamiento a la vez de la hiperinsulinemia basal y de la hiperinsulinemia postprandial.

La hiperinsulinemia basal se caracteriza por una concentración plasmática basal de insulina elevada. El nivel basal corresponde a las concentraciones de insulina aparte de las tomas alimentarias, especialmente cuando el sujeto está en ayunas. El nivel basal fisiológico es generalmente inferior o igual a 10 mU/l en el sujeto sano delgado. Así, una hiperinsulinemia basal puede caracterizarse por un nivel basal, aparte de las tomas alimentarias (especialmente en ayunas), superior a 10 mU/l.

La hiperinsulinemia postprandial corresponde a una respuesta insulínica excesiva como consecuencia de la ingestión de alimentos.

La hiperinsulinemia postprandial puede ponerse en evidencia mediante un ensayo de hiperglucemia provocado por vía oral (HGPO). La respuesta fisiológica en el ensayo HGPO se caracteriza por un pico de secreción insulínica comprendido generalmente entre 30 y 60 mU/l en el sujeto sano delgado. Así, una hiperinsulinemia postprandial puede caracterizarse por una respuesta al ensayo HGPO con un pico de secreción insulínica superior a 60 mU/l.

La concentración plasmática en insulina de un paciente se determina por las técnicas clásicas bien conocidas por el experto en la técnica. En particular, puede realizarse un radioinmunoanálisis (RIA) sobre una muestra de plasma de un paciente (por ejemplo, RIA, Biosource, Medgenix Diagnostics, Rungis, Francia).

El tratamiento de la hiperinsulinemia tiene por objeto reducir la concentración plasmática basal en insulina y/o restablecer una respuesta insulínica fisiológica como consecuencia de la ingestión de alimentos.

La prevención de la hiperinsulinemia tiene especialmente por objeto mantener la concentración plasmática basal en insulina en valores fisiológicos y/o mantener una respuesta insulínica fisiológica como consecuencia de la ingestión de alimentos.

La presente invención tiene particularmente por objeto el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia postprandial.

La presente invención tiene particularmente por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que las cortezas de levadura son del género *Saccharomyces cerevisiae*.

Dichas levaduras son preferiblemente levaduras de panadería. Una levadura de panadería es una levadura que pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, fabricada esencialmente con la ayuda de una multiplicación o cultivo aeróbico como se enseña en la obra de referencia “Yeast Technology”, citada anteriormente, y que no haya servido antes de su autólisis o hidrólisis enzimática para ningún uso, a diferencia de, por ejemplo, a la levadura de cerveza que es un subproducto de la fabricación de la cerveza, y que ha servido por lo tanto para fabricar cerveza antes de su recuperación para su autólisis o hidrólisis enzimática. Esta levadura de cerveza se ha multiplicado esencialmente de manera anaeróbica (siendo la fabricación de la cerveza un proceso anaeróbico).

La presente invención tiene por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que dichas cortezas de levadura tienen un contenido total de glucanos y de mananos de al menos 40,0% en peso sobre materia seca, preferiblemente al menos 45,0% en peso sobre materia seca.

De manera útil, las cortezas de levadura conforme a la invención presentan un contenido en proteínas N x 6,25 de 17,0 a 35,0% en peso sobre materia seca, preferiblemente de 18,0 a 26,0% en peso sobre materia seca.

La invención tiene particularmente por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que dichas cortezas de levadura tienen un contenido en mananos inferior a 30% en peso sobre materia seca.

En un modo de realización preferido de la invención, el contenido en mananos en la corteza de levadura está comprendido entre 20 y 26% en peso sobre materia seca. Este modo de realización corresponde a cortezas de levadura obtenidas por autólisis o hidrólisis enzimática, separación de la fracción solubilizada, y secado de la fracción insoluble, tal como se ha descrito anteriormente y en el ejemplo 1.1 (parte titulada *Preparación de cortezas de levadura que contienen mananos*). Tal producto permite obtener, después de un ensayo de hiperglucemia

provocada por vía oral (HGPO), un pico insulínico reducido con relación a un placebo en pacientes que padezcan diabetes de tipo 2 (véase el ejemplo 2).

5 La presente invención tiene especialmente por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que dichas cortezas de levadura tienen un contenido en mananos inferior a 2% en peso sobre materia seca, especialmente inferior a 1% en peso sobre materia seca, especialmente inferior a 0,1% en peso sobre materia seca.

En otro modo de realización preferida de la invención, el contenido en mananos de las cortezas de levadura es inferior a 0,1% en peso sobre materia seca.

10 Los mananos pueden eliminarse mediante un tratamiento alcalino en caliente. El tratamiento alcalino en caliente consiste en poner en suspensión acuosa las cortezas de levadura según la invención, obtenidas como se ha descrito anteriormente, y calentar la suspensión en medio alcalino entre 70°C y 100°C durante un máximo de tres horas. La fracción solubilizada mediante este tratamiento que contiene una gran parte, incluso la totalidad de las manoproteínas, se elimina por centrifugación y lavado. La fracción no solubilizada restante se recupera y generalmente se seca.

15 Preferiblemente, los mananos se eliminan mediante un tratamiento alcalino en caliente, seguido de un tratamiento ácido, con el fin de eliminar totalmente los mananos.

Estos tratamientos se detallan en la parte ejemplos.

20 Tales productos, obtenidos a partir de las cortezas de levaduras anteriores sometidas a un tratamiento alcalino en caliente, y eventualmente a un tratamiento ácido, tal como se ha descrito anteriormente (véase también el ejemplo 1.1, parte titulada *Preparaciones de las cortezas de levadura desprovistas de mananos*), en los que los mananos se han eliminado en su totalidad o casi en su totalidad (representando los glucanos la mayor parte del contenido total en glucanos y mananos), permiten obtener, después de un ensayo HGPO, un pico insulínico reducido con relación a un placebo, e incluso con relación a las cortezas de levadura en las que los mananos no se han eliminado, en pacientes que padecen de diabetes de tipo 2 o de sobrepeso (véase el ejemplo 2).

25 La presente invención tiene por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que las cortezas de levadura tienen un contenido total en glucanos y mananos inferior o igual a 90% en peso sobre materia seca, especialmente inferior o igual a 80% en peso sobre materia seca, especialmente inferior o igual a 70% en peso sobre materia seca.

30 La presente invención tiene más particularmente por objeto la utilización tal como se ha descrito anteriormente, en la que las cortezas de levadura tienen un contenido total en glucanos y mananos de 45% a 90% en peso sobre materia seca, especialmente de 52% a 80% en peso sobre materia seca, preferiblemente de 65% a 77% en peso, y aun preferiblemente de 72% a 77% en peso sobre materia seca. Así, conforme a un modo de realización particularmente ventajoso, el contenido en glucanos y mananos está comprendido entre 72% y 77% en peso sobre materia seca.

35 Especialmente, en un modo de realización particular, la presente invención tiene por objeto la utilización tal como se ha descrito anteriormente, en la que el contenido en glucanos y mananos está comprendido entre 72% y 77% en peso sobre materia seca, y el contenido en mananos es inferior a 2% en peso sobre materia seca, especialmente inferior a 1% en peso sobre materia seca, especialmente inferior a 0,1%.

Alternativamente, el contenido en glucanos y mananos puede también ser inferior o igual a 55% en masa sobre materia seca, mientras que sea superior a 45% en peso sobre materia seca.

40 Así, conforme a un modo de realización ventajoso, el contenido en glucanos y mananos está comprendido entre 52% y 57% en peso sobre materia seca.

Especialmente, en un modo de realización particular, la presente invención tiene por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que el contenido en glucanos y mananos está comprendido entre 52% y 57% en peso sobre materia seca, y el contenido en mananos es inferior a 2% en peso sobre materia seca, especialmente inferior a 1% en peso sobre materia seca, especialmente inferior a 0,1%.

45 La presente invención tiene por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que las cortezas de levadura tienen un contenido en glucógeno inferior a 8,0% en peso sobre materia seca, preferiblemente inferior a 5,0% en peso sobre materia seca, preferiblemente inferior a 3% en peso sobre materia seca, preferiblemente inferior a 1,0% en peso sobre materia seca, aun preferiblemente inferior a 0,1% en peso sobre materia seca.

50 Con el fin de eliminar totalmente o casi totalmente el glucógeno de la corteza de levadura, las cortezas de levadura conforme a la invención pueden someterse a un tratamiento alcalino en caliente, como se ha descrito anteriormente, y preferiblemente a un tratamiento alcalino en caliente seguido de un tratamiento ácido.

Un tratamiento tal permite realizar las cortezas de levadura conforme a la invención con un contenido total en glucanos y mananos de 45% a 90% en peso sobre materia seca, preferiblemente de 52% a 80% en peso sobre materia seca, preferiblemente de 65% a 77% en peso y aun preferiblemente de 72% a 77% en peso sobre materia

seca. Un tratamiento tal permite especialmente realizar cortezas de levadura que contienen igualmente menos de 1,0% en peso de glucógeno sobre materia seca, preferiblemente menos de 0,1% en peso de glucógeno sobre materia seca.

La composición farmacéutica conforme a la invención puede administrarse en diferentes formas o presentaciones.

- 5 La composición farmacéutica conforme a la invención comprende al menos una sustancia activa representada por las cortezas de levadura y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica conforme a la invención puede comprender una o varias de otras sustancias activas, por ejemplo escogidas entre agentes hipoglucemiantes o insulino-sensibilizadores, y especialmente entre las sulfamidas hipoglucemiantes, biguanida, metformina y derivados de tiazolidinadiona, inhibidores de las α -glucosidasas.

- 10

La preparación puede comprender igualmente una o varias vitaminas, especialmente escogidas entre la vitamina A, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6, B8 (biotina), B9 (ácido fólico), B12 (cobalamina) y/o uno o varios minerales alimentarios, especialmente escogidos entre el calcio, fósforo, potasio, sodio, magnesio y hierro.

- 15 La presente invención tiene igualmente por objeto composiciones farmacéuticas tales como las definidas anteriormente, que comprenden cromo.

La composición farmacéutica puede comprender uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un modo de realización preferido, la composición farmacéutica conforme a la invención es apropiada para una administración por vía oral.

- 20 La composición farmacéutica puede presentarse especialmente en forma de comprimido, cápsula, píldora, polvo, granulados o suspensión.

La composición farmacéutica conforme a la invención puede presentarse en particular en forma de una dosis de ingestión que corresponde a una cantidad de materia seca de cortezas de levadura conforme a la invención, inferior a 10 g, preferiblemente de 8 a 9 g.

- 25 En un modo de realización preferido, la presente invención tiene por objeto la utilización tal como se ha definido anteriormente, en la que las cortezas de levadura presentan un contenido en materia seca superior o igual a 90%, preferiblemente superior o igual a 94% y aun preferiblemente superior o igual a 96% en peso.

Un contenido en materia seca superior o igual a 90%, especialmente superior o igual a 94%, aun preferiblemente superior o igual a 96%, permite una mejor conservación de las cortezas de levadura, especialmente una mejor estabilidad bacteriológica y una mejor estabilidad con respecto a reacciones indeseables de origen enzimático o no.

- 30

La presente invención tiene por objeto la utilización de cortezas de levadura tal como se ha definido anteriormente, para la prevención y/o el tratamiento de la hiperinsulinemia, que se trate de hiperinsulinemia basal o postprandial, sea cual sea el origen de la hiperinsulinemia.

- 35 La presente invención tiene particularmente por objeto la utilización de cortezas de levadura tal como se ha definido anteriormente, para la prevención y/o el tratamiento de la hiperinsulinemia asociada a una resistencia a la insulina, a un sobrepeso, a la obesidad, o al síndrome metabólico, en todo tipo de paciente que padezca de hiperinsulinemia de este origen.

Sin embargo, aunque la invención esté destinada a la prevención y al tratamiento de todo tipo de hiperinsulinemias, en todo tipo de pacientes, en un modo de realización ventajoso, las cortezas conforme a la invención se utilizan para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de la hiperinsulinemia en un paciente no diabético. En este caso, la presente invención tiene particularmente por objeto la utilización de cortezas de levadura tal como se ha definido anteriormente, para la prevención y/o el tratamiento de la hiperinsulinemia asociada a una resistencia a la insulina, a un sobrepeso, a la obesidad, o al síndrome metabólico, siempre en sujetos no diabéticos.

- 40

Alternativamente, las cortezas conforme a la invención pueden utilizarse igualmente para la preparación de un medicamento destinado a la prevención y/o al tratamiento de la hiperinsulinemia en un paciente con diabetes de tipo 2. La presente invención tiene entonces particularmente por objeto la utilización de cortezas de levadura tal como se ha definido anteriormente, para la prevención y/o el tratamiento de la hiperinsulinemia asociada a una resistencia a la insulina, a un sobrepeso, a la obesidad, o al síndrome metabólico, en un sujeto con diabetes de tipo 2.

- 45

- 50 Por "diabetes de tipo 2", se hace referencia igualmente a la diabetes no insulino dependiente (DNID). La diabetes de tipo 2 se caracteriza por una glucemia en ayunas superior a 1,26 g/l.

Cuando la glucemia en ayunas está entre 1,10 g/l y 1,26 g/l, se habla de anomalía de la glucemia.

La presente invención tiene especialmente por objeto la utilización de cortezas de levadura tal como se ha definido anteriormente, para la prevención y/o el tratamiento de la hiperinsulinemia en los primeros estadios de la diabetes de tipo 2.

5 Por "resistencia a la insulina", se hace referencia a la falta de respuesta de los tejidos insulino dependientes a la acción de la insulina. El páncreas continúa entonces secretando insulina, cuya concentración plasmática se vuelve demasiado elevada.

Por "sobrepeso" y "obesidad", se quiere decir un exceso de peso. En el adulto, el sobrepeso se caracteriza por un índice de masa corporal (IMC) que comprende de 25 a 30 kg/m² y la obesidad por un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m². El índice de masa corporal de un individuo está definido por la fórmula siguiente:

$$10 \quad \text{IMC} = \frac{\text{masa (kg)}}{(\text{estatura (m)})^2}$$

La expresión "sobrepeso u obesidad en sujetos no diabéticos" hace referencia a un sobrepeso o a una obesidad tales como se han definido anteriormente, en sujetos en los que la glucemia está regulada correctamente.

15 En particular, la concentración plasmática en glucosa de sujetos no diabéticos en ayunas es inferior a 1,26 g/l (7 mmol/l), especialmente inferior a 1,10 g/l (6,1 mmol/l).

La expresión "síndrome metabólico" se utiliza para hacer referencia a un conjunto de factores de riesgo de desarrollo de trastornos cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares (ACV) y diabetes de tipo 2.

El diagnóstico del síndrome metabólico se basa en la evaluación de varios parámetros, especialmente el contorno de cintura, la concentración de colesterol y de triglicéridos, la glucemia en ayunas, la insulinemia y la tensión arterial.

20 En particular, conforme al NCEP-ATPIII (Nation Cholesterol Education Program – Adult treatment Panel III), el síndrome metabólico se diagnostica si tres o más de los factores de riesgo siguientes están presentes:

- contorno de cintura superior a 88 cm en la mujer y superior a 102 cm en el hombre,
- concentración de colesterol HDL inferior a 1 mmol/l en el hombre y 1,2 mmol/l en la mujer,
- concentración de triglicéridos superior o igual a 1,7 mmol/l,
- 25 - glucemia en ayunas superior o igual a 6,1 mmol/l,
- tensión arterial superior a 130 mm de Hg / 85 mm de Hg.

La hiperinsulinemia postprandial puede jugar especialmente un papel en el desarrollo del síndrome metabólico.

30 La presente invención se refiere igualmente a un método para el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia en un paciente, que comprende la administración al paciente de una composición farmacéutica conforme a la invención.

El método para el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia puede ser en particular un método para el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia asociada a una resistencia a la insulina, a un sobrepeso, a la obesidad, o al síndrome metabólico. En un modo de realización ventajoso, el paciente es un paciente no diabético. Alternativamente, el paciente puede ser igualmente un paciente con diabetes de tipo 2.

35 La invención se refiere en particular a un método tal en el que la composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral.

Los diferentes métodos conforme a la invención pueden comprender en particular la administración al paciente de la composición farmacéutica en una dosis diaria que corresponde a de 1 a 10 g, preferiblemente de 8 a 9 g de cortezas de levadura conforme a la invención, pudiendo administrarse dicha dosis diaria en una sola dosis o en un solo momento de administración, como por ejemplo en el desayuno, o aun en varias dosis parciales, es decir, de manera repartida durante la jornada.

40 Los métodos conforme a la invención pueden comprender igualmente al menos una etapa de verificación de la concentración basal de insulina del paciente y/o de su respuesta insulínica en respuesta a la ingestión de alimentos o de un ensayo HGPO, después de la administración de la composición farmacéutica anterior de manera aguda o crónica.

45 La presente invención se refiere igualmente a un método para reducir o estabilizar la concentración plasmática basal de insulina en un paciente que padezca hiperinsulinemia basal, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica conforme a la invención.

El método para reducir o estabilizar la concentración plasmática basal de insulina puede en particular dirigirse a un paciente que padezca hiperinsulinemia basal asociada a una resistencia a la insulina, a un sobrepeso, a la obesidad, o al síndrome metabólico. En un modo de realización ventajoso, el paciente es un paciente no diabético. Alternativamente, el paciente puede ser igualmente un paciente con diabetes de tipo 2.

- 5 La presente invención se refiere igualmente a un método para reducir el pico de secreción insulínica como consecuencia de la ingestión de alimentos en un paciente que padezca de hiperinsulinemia postprandial, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica conforme a la invención.

- 10 El método para reducir el pico de secreción insulínica como consecuencia de la ingestión de alimentos puede dirigirse en particular a un paciente que presenta una hiperinsulinemia postprandial asociada a una resistencia a la insulina, a un sobrepeso, a la obesidad, o al síndrome metabólico. En un modo de realización ventajoso, el paciente es un paciente no diabético. Alternativamente, el paciente puede ser igualmente un paciente diabético con diabetes de tipo 2.

Descripción de las figuras

- 15 Figura 1: cinética de evolución de la insulinemia postprandial en sujetos con sobrepeso (n = 12).

Los resultados de 3 días de exploración se dan como media +/- ESM (error estándar de la media). La insulinemia de los sujetos testigo que han ingerido leche figura en línea continua y cuadrados, los sujetos que han ingerido cortezas de levadura desprovistas de mananos (betaglucanos) en guiones y rombos, y los sujetos que han ingerido las cortezas de levadura con mananos en línea de puntos y triángulos. La concentración de insulina (en mU/l) se da en función del tiempo en minutos (min).

Figura 2: evolución de la insulinemia postprandial representada en área bajo la curva (ABC) en sujetos con sobrepeso (n = 12).

Los resultados de 3 días de exploración se dan en media +/- ESM. El área bajo la curva obtenida en los sujetos testigo que han ingerido leche figura en negro, en los sujetos que han ingerido cortezas de levadura desprovistas de mananos (betaglucanos) en puntos apretados y en los sujetos que han ingerido cortezas de levadura con mananos en puntos espaciados. El área de insulinemia (en mU/l*tiempo) se da para el periodo de 0-300 minutos (tot), el periodo de 0-120 minutos y el periodo de 120-300 minutos.

Figura 3: cinética de evolución de la insulinemia postprandial en sujetos con diabetes de tipo 2 (n = 11).

Los resultados de 3 días de exploración se dan en media +/- ESM. La insulinemia de los sujetos testigo que han ingerido leche figura en línea continua y cuadrados, los sujetos que han ingerido cortezas de levadura desprovistas de mananos (betaglucanos) en guiones y rombos, y los sujetos que han ingerido cortezas de levadura con mananos en línea de puntos y triángulos. La concentración de insulina (en mU/l) se da en función del tiempo en minutos (min).

Figura 4: evolución de la insulinemia postprandial representada en área bajo la curva (ABC) en sujetos diabéticos de tipo 2 (n = 11).

Los resultados de 3 días de exploración se dan en media +/- ESM. El área de insulinemia de los sujetos testigo que han ingerido leche figura en negro, los sujetos que han ingerido cortezas de levadura desprovistas de mananos (betaglucanos) en puntos apretados y en los sujetos que han ingerido cortezas de levadura con mananos en puntos espaciados. El área de insulinemia (en mU/l*tiempo) se da para el periodo de 0-300 minutos (tot), el periodo de 0-120 minutos y el periodo de 120-300 minutos.

Ejemplos

Ejemplo I: obtención de cortezas de levadura conforme a la invención

1. Material y métodos

Preparación de cortezas de levadura que contienen mananos

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

De manera práctica, en general, las autólisis o hidrólisis enzimáticas conforme a la invención se realizan entre 45°C y 55°C durante 18 a 36 horas, sin el empleo de ninguna enzima que pueda solubilizar los glucanos o las manoproteínas.

La fracción solubilizada se separa de la fracción insoluble mediante varias etapas sucesivas de centrifugación y de lavado con agua.

La fracción insoluble se seca sobre tambores calentados hasta un contenido en materia seca de 95% en peso. Los aglomerados formados se retiran por tamizado y se obtienen cortezas de levadura conforme a la invención.

5 Preparación de cortezas de levadura desprovistas de mananos

Las cortezas de levadura obtenidas anteriormente se ponen en suspensión acuosa y se calientan en medio alcalino entre 70°C y 100°C durante tres horas máximo. En particular, la suspensión en medio acuoso alcalino sodado se calienta a 85°C durante dos horas.

10 La fracción solubilizada por este tratamiento se elimina, la fracción no solubilizada restante se recupera, se lava y generalmente se seca. La fracción solubilizada que contiene las manoproteínas e igualmente el glucógeno, se elimina por centrifugación y lavado.

15 Las cortezas de levadura obtenidas después del tratamiento alcalino en caliente se someten preferiblemente a un tratamiento ácido con el fin de eliminar toda traza de manoproteínas. La fracción insoluble se acidifica así con ácido fosfórico o acético, luego se incuba a 80°C durante de una a dos horas. La fracción solubilizada que contiene los residuos de manoproteínas, glucógeno e igualmente algunos lípidos se elimina por centrifugación y lavado.

Medida del contenido en glucógeno

Se añade 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 se mantiene esta mezcla a 95°C durante 4 horas.

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

Se incuban 0,5 ml de la suspensión así obtenida durante 15 horas en presencia de un exceso de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, tal como la comercializada por la compañía Roche con el número de catálogo 102 857, a 55°C.

Después de centrifugación, se mide la glucosa liberada por determinación enzimática.

25 La determinación enzimática de glucosa se describe especialmente en el manual "Methods of Biochemical Analysis and Food Analysis – using Single Reagents", publicado por Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, © 1989, páginas de 50 a 55, y se realiza preferiblemente utilizando el "Test-Combination D-Glucose/-Fructose", número de catálogo 139 106 de la filial de la sociedad Roche: Boehringer Mannheim GmbH/R-Biopharm GmbH en Darmstadt, Alemania.

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

Medida del contenido total de glucanos y mananos

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

35 Después, se neutraliza la disolución ácida obtenida de este modo y se determina por vía enzimática la cantidad de glucosa y respectivamente de manosa en la disolución neutralizada.

Esta determinación enzimática de glucosa y manosa está descrita igualmente en las páginas de 50 a 55 del manual citado anteriormente, y se realiza preferiblemente utilizando el "Test-Combination" de número de catálogo 139 106.

40 Se hace la diferencia entre la cantidad de glucosa (expresada en mg), determinada conforme a este método, y la cantidad de glucosa (expresada igualmente en mg) determinada para estas cortezas de levadura por el método para la medida del contenido en glucógeno anterior.

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

45 La cantidad (en mg) de manosa determinada corresponde a la cantidad total de mananos presente en la muestra, expresándose esta cantidad en masa equivalente de manosa.

2. Resultados

Las levaduras de levadura obtenidas de este modo presentan un contenido en materia seca de 95% en peso.

La composición de las cortezas de levadura que contienen mananos y de las cortezas de levadura desprovistas de mananos (obtenidas por tratamiento alcalino en caliente) se da en la tabla 1.

Tabla 1: composición de las cortezas de levadura conforme a la invención

	Cortezas de levadura que contienen mananos		Cortezas de levadura desprovistas de mananos	
	Análisis en g por 100 g de producto	Aporte energético en kcal/g	Análisis en g por 100 g de producto	Aporte energético en kcal/g
Gúcidos, donde	49,9	2,046	55,1	2,259
Glucanos	28,2		55,1	
Mananos	21,7		0	
Proteínas	23,6	1,298	2,2	0,121
Lípidos	11,8	1,109	21,6	2,03

- 5 Para los dos tipos de cortezas de levadura, el contenido en glucógeno era inferior a 10% en peso sobre materia seca.

Ejemplo 2: efecto de las cortezas de levadura conforme a la invención sobre la concentración de insulina de sujetos con sobrepeso no diabéticos y de sujetos diabéticos no insulino dependientes (DNID).

- 10 Más adelante, las cortezas de levadura que contienen mananos se califican como "cortezas de levadura" y las cortezas de levadura desprovistas de mananos se califican como "betaglucanos".

1. Material y métodos

Sujetos, características y tamaño de la muestra

Se reclutaron 24 sujetos voluntarios de 2 tipos: 12 sujetos con sobrepeso sanos y 12 sujetos con diabetes de tipo 2 (hombres o mujeres).

- 15 Para los sujetos con sobrepeso, los criterios de inclusión son: un índice de masa corporal comprendido entre 25 y 30 kg/m² (límites incluidos), edad comprendida entre 30 y 65 años (límites incluidos), glucemia en ayunas normal (< 7 mmol/l, HbA1c < 6%, colesterol total ≤ 7,0 mmol/l, triglicéridos ≤ 4,0 mmol/l.

- 20 Para los sujetos con diabetes de tipo 2, los criterios de inclusión son: edad comprendida entre 30 y 65 años (límites incluidos), tratamiento mediante metformina y/o sulfamidas hipoglucemiantes y/o glinidas y/o glitazonas desde al menos 3 meses, HbA1c < 10%, colesterol total ≤ 7,0 mmol/l, triglicéridos ≤ 4,0 mmol/l.

- 25 Los criterios principales de exclusión son: diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 tratada con insulina o acarbosa, insuficiencia renal o hepática crónica, antecedentes de enfermedad gastrointestinal crónica, patología endocrina, tratamiento que puede interferir con el metabolismo de los glúcidos y el comportamiento alimentario, intolerancia a la leche de vaca, claustrofobia (medidas calorimétricas con Canopy®), mujeres embarazadas, sujetos que son grandes consumidores de productos contenidos en la lista de alimentos a prohibir.

Sólo un sujeto diabético se reveló insulino péxico durante la primera hiperglucemia provocada, y fue por lo tanto excluido del estudio puesto que no respondía a los criterios de inclusión definidos. Los otros 23 sujetos completaron el estudio.

Ensayos de hiperglucemias provocadas por vía oral (HGPO)

- 30 El ensayo se desarrolló durante 3 días de hospitalización separados por un intervalo de 7 a 14 días. Cada sujeto se benefició de cada una de las 3 HGPO en un orden aleatorio por sorteo.

8 g de cortezas de levadura y de 9 g de betaglucanos se utilizan en los ensayos HGPO. Cabe señalar que el consumo de cortezas de levadura a la dosis prevista de 8 g no supera los niveles de consumo observados para las levaduras de panadería y las levaduras de alimentos.

- 35 Los productos se diluyen en 167 ml de una disolución de ¹³C glucosa al 30% que contiene 50 g de ¹³C glucosa. Para la comida de ensayo placebo, los 167 ml de disolución de ¹³C glucosa se añadirán con 28 ml de leche entera y 50 ml de leche semidesnatada con el fin de obtener un aporte energético equivalente a 8 g de levadura y a 9 g de betaglucanos.

- 40 La jornada metabólica se divide en dos partes: un periodo basal (T-120 a T0) durante el cual se miden las condiciones basales (en ayuno), después el periodo postprandial de 4 h 45 (T15 – T300) consecutivo al HGPO.

Durante el ensayo HGPO, el paciente ingiera 50 g de ¹³C glucosa en el T0. En función del sorteo, se añade eventualmente de manera extemporánea a la disolución, o cortezas de levadura, o betaglucanos, o leche. La

disolución debe ingerirse en menos de 10 minutos. El paciente debe permanecer en decúbito durante las 5 horas siguientes, evitando dormir. Durante la jornada de exploración, el sujeto puede consumir agua (300 ml) máximo.

Las concentraciones plasmáticas de insulina se determinan en basal (entre T-120 y T0) y en el periodo postprandial de T15 a T300. Las extracciones venosas se centrifugan inmediatamente y el plasma se recupera para la determinación de la insulina. La determinación de la insulina plasmática se realiza por radioinmunoanálisis (Medgenix Diagnostics®, Rungis, Francia).

Tratamiento estadístico

Los resultados se presentan en forma media por grupo $\pm$ error estándar de la media (ESM). Los resultados obtenidos con las 3 condiciones (cortezas de levadura, betaglucanos y placebo (leche)) se comparan dos a dos con la ayuda de la prueba no paramétrica de Wilcoxon sobre series emparejadas. Para llevar a cabo estas pruebas estadísticas, se utiliza el programa informático Statview (Startview, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

2. Resultados

Se constata una buena tolerancia digestiva de los dos productos de levadura ensayados en los sujetos.

Evolución de la insulinemia durante los 3 HGPO en los sujetos con sobrepeso

El aumento de la insulinemia en respuesta a la carga oral de glucosa es significativamente menos elevado en presencia de betaglucanos que con el placebo.

El pico insulínico es significativamente más débil en presencia de betaglucanos que con el placebo ($63,0 \pm 7,7$ mU/l frente a $91,6 \pm 13,4$ mU/l para la condición de leche ($p < 0,01$) (figura 1). El área bajo la curva de la insulinemia en presencia de betaglucanos es más débil con relación al placebo de manera significativa ($p < 0,05$) (figura 2 y tabla 2).

Tratándose de cortezas de levadura, se observa una tendencia a una disminución del pico insulínico y del área bajo la curva con relación al placebo.

Tabla 2: pico insulínico en mU/l y áreas bajo la curva de insulinemia en mU/l*tiempo en los sujetos con sobrepeso. Los resultados se expresan en media $\pm$ ESM ($n = 12$). $p < x$ = diferencia significativa con relación al placebo (leche).

Insulinemia, sobrepeso	Leche	cortezas de levadura	betaglucanos
Pico insulínico	$91,6 \pm 13,4$	$84,2 \pm 13,2$	$63,0 \pm 7,7$ $p < 0,01$
Área bajo la curva 0-300 min	8715 ± 1130	8570 ± 1444	6736 ± 591 $p < 0,05$
Área bajo la curva 0-120 min	6499 ± 903	6214 ± 960	4816 ± 504 $p < 0,05$
Área bajo la curva 120-300 min	2216 ± 335	2356 ± 548	1920 ± 158

Evolución de la insulinemia durante los 3 HGPO en sujetos con diabetes de tipo 2

En los sujetos con diabetes de tipo 2, se observa igualmente una disminución de la respuesta insulínica en presencia de betaglucanos, así como en presencia de cortezas de levadura.

El pico insulínico se reduce de manera significativa a la vez en presencia de betaglucanos y de cortezas de levadura (respectivamente $44,2 \pm 6,0$ mU/l y $43,8 \pm 4,7$ mU/l frente a $56,1 \pm 8,8$ mU/l para la leche, $p < 0,05$) (figura 3 y tabla 3).

El área bajo la curva se reduce igualmente de manera significativa en presencia de cortezas de levadura y de betaglucanos, con relación al placebo (figura 4 y tabla 3).

Tabla 3: pico insulínico en mU/l y áreas bajo la curva de insulinemia en mU/l*tiempo en los sujetos con diabetes de tipo 2. Los resultados se expresan en media $\pm$ ESM ($n = 11$). $p < x$ = diferencia significativa con relación al placebo (leche).

Insulinemia, diabéticos	leche	cortezas de levadura	betaglucanos
Pico insulínico	$56,1 \pm 8,8$	$43,8 \pm 4,7$ $p < 0,05$	$44,2 \pm 6,0$ $p < 0,05$
Área bajo la curva 0-300 min	9049 ± 1070	7947 ± 821 $p = 0,05$	8248 ± 878 $p < 0,05$

Insulinemia, diabéticos	leche	cortezas de levadura	betaglucanos
Área bajo la curva 0-120 min	4325 +/- 619	3644 +/- 381	3708 +/- 404
Área bajo la curva 120-300 min	4725 +/- 587	4303 +/- 502	4540 +/- 498

Los resultados de insulinemia de las dos poblaciones, los sujetos con sobrepeso no diabéticos y los sujetos con diabetes de tipo 2, muestran por lo tanto una disminución significativa de la respuesta insulínica en el transcurso de la ingestión de cortezas de levadura desprovistas de mananos. Lo mismo en el transcurso de la ingestión de cortezas de levadura que contienen mananos en sujetos con diabetes de tipo 2.

5

Reivindicaciones

1. Cortezas de levadura para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la hiperinsulinemia en un paciente no diabético, donde la hiperinsulinemia está asociada a una resistencia a la insulina, a un sobrepeso, a la obesidad o al síndrome metabólico, obteniéndose dichas cortezas de levadura por autólisis o hidrólisis enzimática de células de levadura, y que tienen:
 - un contenido total de glucanos y mananos de al menos 34,0% en peso sobre materia seca, y
 - un contenido en glucógeno inferior a 10,0% en peso sobre materia seca.
2. Cortezas de levadura para la utilización conforme a la reivindicación 1, en la que dicha autólisis o hidrólisis enzimática de células de levadura consiste en:
 - someter una suspensión acuosa de células de levadura a una hidrólisis, utilizando las enzimas endógenas de dichas células de levadura y eventualmente añadiendo proteasas exógenas a dichas células de levadura,
 - separar la fracción insoluble producida, y
 - secar la fracción insoluble separada para obtener cortezas de levadura.
3. Cortezas de levadura para la utilización conforme a la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que dicha autólisis o hidrólisis enzimática se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 45°C y 55°C durante 18 a 36 horas.
4. Cortezas de levadura para la utilización conforme a la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que dicha autólisis o hidrólisis enzimática de células de levadura consiste además en:
 - calentar una suspensión acuosa de cortezas de levadura obtenidas en un medio alcalino a una temperatura comprendida entre 70°C y 100°C durante 3 horas a lo sumo, y
 - separar la fracción insoluble para obtener cortezas de levadura desprovistas de mananos.
5. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las cortezas de levadura son del género *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dichas cortezas de levadura tienen un contenido total de glucanos y mananos de al menos 40,0% en peso sobre materia seca.
7. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dichas cortezas de levadura tienen un contenido total en mananos inferior a 30% en peso sobre materia seca.
8. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dichas cortezas de levadura tienen un contenido en mananos inferior a 2% en peso sobre materia seca.
9. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que las cortezas de levadura tienen un contenido total en glucanos y mananos inferior o igual a 90% en peso sobre materia seca.
10. Cortezas de levadura para la utilización conforme a la reivindicación 12, en la que el contenido en glucanos y mananos es inferior o igual a 80% en peso sobre materia seca.
11. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que las cortezas de levadura tienen un contenido total en glucanos y mananos de 45% a 90% en peso sobre materia seca.
12. Cortezas de levadura para la utilización conforme a la reivindicación 11, en la que el contenido total en glucanos y mananos es de 52% a 80% en peso sobre materia seca.
13. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las cortezas de levadura tienen un contenido en glucógeno inferior a 8,0% en peso sobre materia seca.
14. Cortezas de levadura para la utilización conforme a las reivindicación 13, en la que el contenido en glucógeno es inferior a 5,0% en peso sobre materia seca.
15. Cortezas de levadura para la utilización conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que las cortezas de levadura presentan un contenido en materia seca superior o igual a 90%.

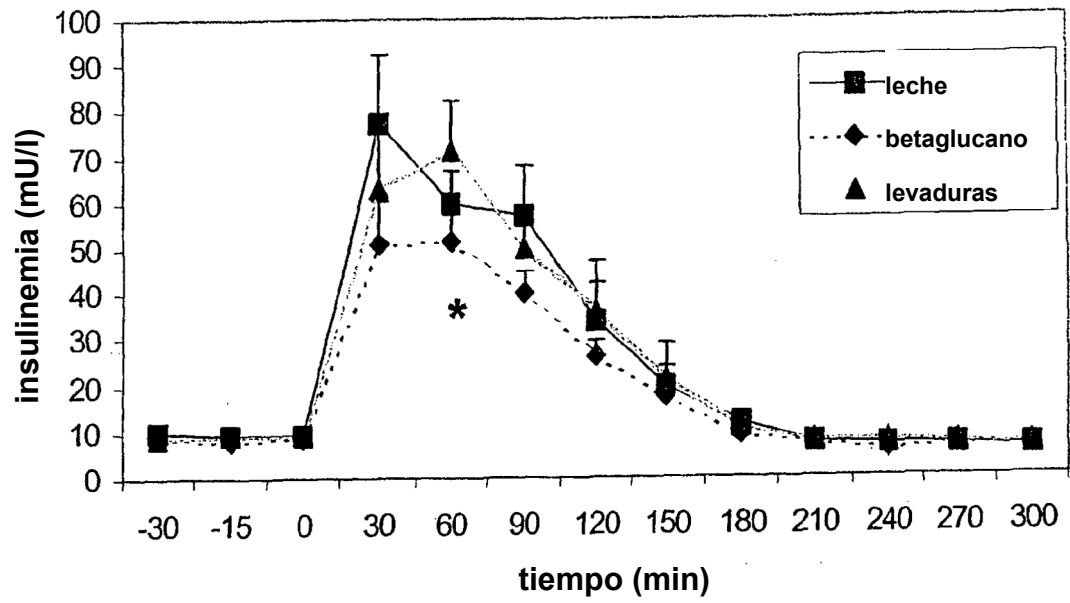


Figura 1

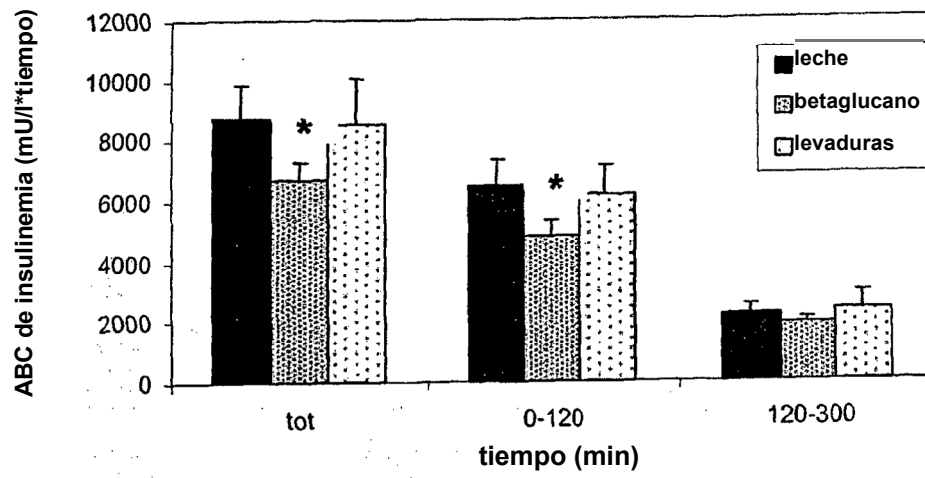


Figura 2

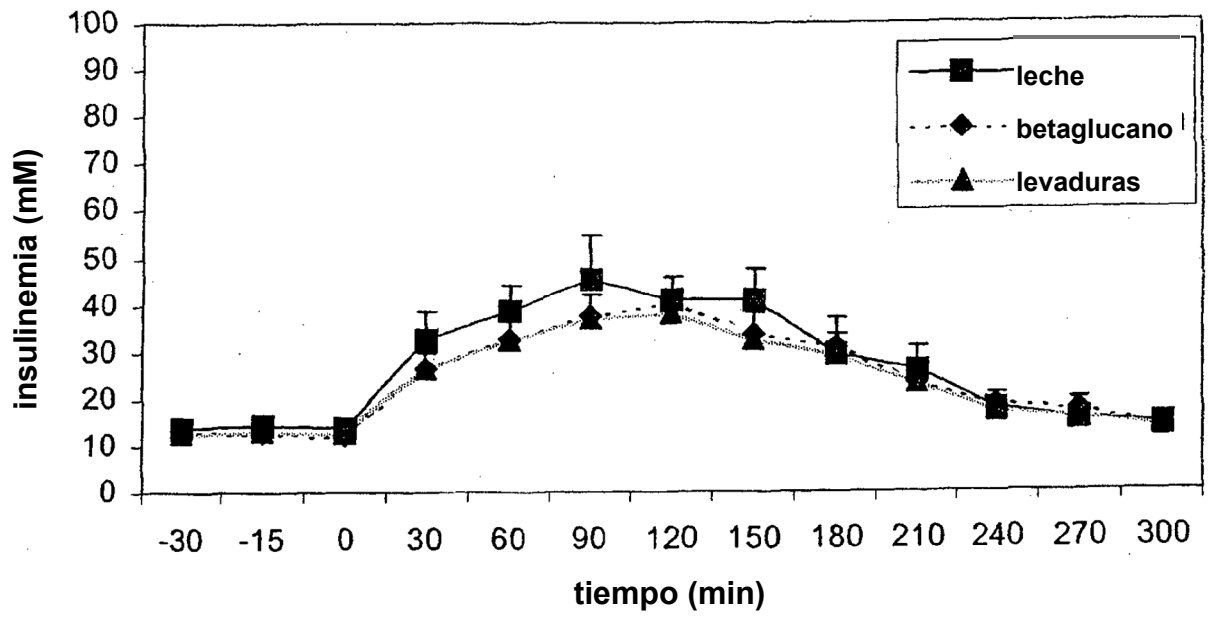


Figura 3

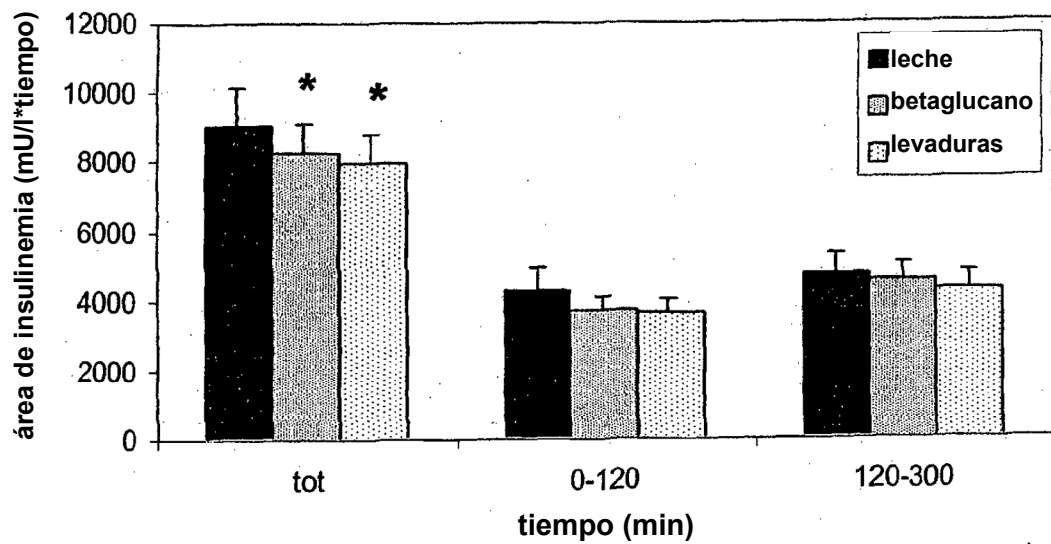


Figura 4