(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 601 517**

(51) Int. Cl.:

A61K 8/11	(2006.01)
A61K 38/47	(2006.01)
C12N 9/24	(2006.01)
C12R 1/25	(2006.01)
C12R 1/225	(2006.01)
C12R 1/46	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2007** **E 09154632 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016** **EP 2078758**

(54) Título: **Absorción duradera de flavonoides**

(30) Prioridad:

24.08.2006 EP 06017678

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2017

(73) Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

(72) Inventor/es:

RICHELLE, MYRIAM;
WILLIAMSON, GARY;
JANKOVIC, IVANA y
REIN, MAARIT

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 601 517 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

Absorción duradera de flavonoides

Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere a una bacteria que tiene actividad alfa-ramnosidasa y al uso de de la misma para producir α-ramnosidasa.

Estado técnico anterior

Los flavonoides o bioflavonoides son un grupo ubicuo de sustancias polifenólicas que existen en la mayoría de las plantas y están concentrados en las semillas, en la piel o en la cáscara de los frutos, en la corteza y en las flores. Un gran número de medicinas vegetales contiene flavonoides que han sido mencionados por muchos autores por tener actividad antibacteriana, antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica, antimutágena, antivírica, antineoplásica, antitrombótica y vasodilatadora.

En la patente WO 2005/058255 A1 se describen desarrollos recientes que también demuestran los beneficios de las composiciones que contienen flavanonas para mejorar la piel, el cabello y el pelaje de humanos o mascotas.

En la naturaleza estos compuestos se presentan principalmente como glicósidos. Esta conjugación con azúcares influye marcadamente en su cinética de absorción. Por ejemplo, los glucósidos flavonoides tienen una absorción rápida y temprana, mientras que los rutinósidos flavonoides (glucósidos de ramnosa) tienen una absorción lenta y tardía.

En los mamíferos la biodisponibilidad de rutinósidos flavonoides tales como la hesperidina es lenta y tardía debido a la falta del enzima α-ramnosidasa en el intestino delgado, que eliminaría la parte de ramnosa de dichos rutinósidos flavonoides. Esto hace que los rutinósidos flavonoides tarden tiempo en avanzar por el tracto gastrointestinal hasta el colon.

En la patente JP 2003-073279 se describen alimentos y bebidas saludables que contienen glicósidos flavonoides de acción prolongada, incluyendo en el producto alimenticio una mezcla de flavonoides que tienen varios grados de glicosilación de manera que tenga lugar la absorción a través del tracto gastrointestinal.

La patente JP 2000-078955 también describe un modo de mejorar la absorción de los flavonoides en alimentación o en medicina, proporcionando una mezcla de flavonoides fisiológicamente activos y derivados de ellos.

Asimismo Espin J.C. y otros describen en el Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(20), p. 6136-6142, la producción de flavonoides glucósidos biodisponibles en zumos de fruta y en té verde, lo cual se logra tratando los zumos de fruta y el té verde con enzimas ramnosidasa procedentes de *Aspergillus aculeatus.*

La patente EP 1 325 749 A1, Gao Yu-Long y otros: “Effects of high hydrostatic pressure on energy metabolism of Lactobacillus plantarum [*Efectos de la presión hidrostática elevada en el metabolismo energético de Lactobacillus plantarum*]”, vol. 46, nº 1, febrero 2006, páginas 68-73, y Russel K. Chan y otros: “Construction and use of a computerized DNA fingerprint database for lactic acid bacteria from silage [*Construcción y uso de una base de datos computarizada de huellas de ADN para bacterias de ácido láctico procedentes de forraje ensilado*]”, Journal of Microbiological Methods, vol. 55, 2003, revelan varias bacterias de ácido láctico tales como la cepa de L. crispatus YIT 02121 (ATCC33820) y la cepa de Lactobacillus plantarum (ATCC8014).

Hashimoto W. y otros: “Molecular identification of an alpha-L-rhamnosidase from Bacillus sp. strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan [*Identificación molecular de una alfa-L-ramnosidasa de la cepa bacillus sp. GL1 como enzima involucrado en el metabolismo completo de la goma gellan*]”, Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 415, nº 2, 15 de julio de 2003, páginas 235-244, Wataru Hashimoto y otros: “Characterization of alpha-L-rhamnosidase of bacillus sp. GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan [*Caracterización de alfa-L-ramnosidasa bacillus sp. GL1 responsable de la completa despolimerización de la goma gellan”*], Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 368, nº 1, 1 de agosto de 1999, páginas 56-60, y Zhongly Cui y otros: “Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the family GH78 alpha-L-rhamnosidase RhaB from bacillus sp. GL1 [*Cristalización y análisis cristalográfico preliminar de la familia GH78 de alfa-L-ramnosidasa RhaB de bacillus sp. GL1*]”, Acta Crystallographica section F, vol. 62, julio de 2006, páginas 646-648, se refieren a varias bacterias que tienen actividad alfa-ramnosidasa.

Resumen de la presente invención

La presente invención se refiere a una bacteria que tiene actividad α-ramnosidasa, el *Lactobacillus gasseri*. La presente invención se refiere asimismo al uso de esta bacteria para producir α-ramnosidasa.

A continuación se describe más detalladamente la presente invención, haciendo referencia a algunas de sus formas de ejecución mostradas en las figuras adjuntas:

- Figura 1a: representa la estructura molecular de la hesperidina,
- Figura 1b: representa la estructura molecular del hesperetín-7-glucósido,
- Figura 1c: representa la estructura molecular de la hesperetina, y
- Figura 2: representación gráfica comparativa de los niveles de hesperetina en plasma, dependiendo de si solo se ingiere hesperetín-7-glucósido, de si solo se ingiere hesperidina o de si solo se consume una composición según la presente invención.
- Figura 3: muestra la desaparición de hesperidina *in vitro* en condiciones parecidas a las del intestino delgado (pH 6) y en presencia de α-ramnosidasa pura (CTRL+), en presencia de células intactas de *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 EC), en presencia de células rotas *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 CE) o en ausencia de cualquier bacteria/enzima (CTRL-).
- Figura 4: muestra la formación de hesperetín-7-glucósido a pH 6 (calculada a partir de la cantidad inicial de hesperidina (100%)), donde CTRL+, CTRL-, 907 CE y 907 EC tienen el mismo significado que en la figura 3.
- Figura 5: muestra la formación de hesperetina a pH 6 al tratar hesperidina con células intactas o rotas de *Lactobacillus gasseri* (CNCM I-3795).
- Figura 6: muestra la desaparición de hesperidina *in vitro* en condiciones parecidas a las del estómago después de la digestión de una comida (pH 4) y en presencia de α-ramnosidasa pura (CTRL+), en presencia de células intactas de *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 EC), en presencia de células rotas *Lactobacillus gasseri* CNCM I-3795 (907 CE) o en ausencia de cualquier bacteria/enzima (CTRL-).
- Figura 7: muestra la formación de hesperetín-7-glucósido a pH 4 (calculada a partir de la cantidad inicial de hesperidina (100%)), donde CTRL+, CTRL-, 907 CE y 907 EC tienen el mismo significado que en la figura 3.
- Figura 8: ilustra el resultado del ensayo TIM1. Hidrólisis de hesperidina a hesperetín-7-glucósido controlada durante 3 horas en el estómago y en el intestino delgado, utilizando cepas bacterianas de Lactobacillus gasseri (CNCM I-3795). La figura demuestra que los enzimas bacterianos son poco activos en el estómago, solo de manera notable en el intestino delgado, y que la cantidad de hesperidina hidrolizada disminuye a medida que el compuesto baja por el tracto GI.

El microorganismo productor de α-ramnosidasa utilizado en las composiciones o métodos de la presente invención es una bacteria *Lactobacillus gasseri.*

Con mayor preferencia el microorganismo se selecciona de *Lactobacillus gasseri* (CNCM I-3795).

Por lo tanto un microorganismo con actividad α-ramnosidasa seleccionado de *Lactobacillus gasseri* (CNCM I-3795) es parte de la presente invención.

En las composiciones de la presente invención el microorganismo está contenido preferiblemente en una proporción de 10^6-10^{10} ufc/g, con mayor preferencia de 10^9 ufc/g.

El microorganismo capaz de producir α-ramnosidasa también puede estar encapsulado. La encapsulación de microorganismos es un método bien conocido del especialista en la materia.

Los flavonoides usados como referencia se pueden elegir entre cualquier flavonoide que comprenda un fragmento de ramnosa. El flavonoide que lleva ramnosa se puede elegir del grupo formado por hesperidina, rutina, eriotricina, naringina, neohesperidina, diosmina, linarina, poncirina, prunina, etc., y cualquier combinación posible de esta relación que incluya dos o más componentes de la misma. El flavonoide es preferiblemente hesperidina (fig. 1a).

La hesperidina (fig. 1a) comprende un fragmento de rutinosa (ramnosa-glucosa). En presencia de un enzima α-ramnosidasa activo el fragmento de ramnosa puede separarse en cierta medida dando el hesperetín-7-glucósido (fig. 1b). A su vez el hesperetín-7-glucósido puede ser escindido por otros enzimas, p.ej. por enzimas glucosidasa presentes en el tracto gastrointestinal, para dar hesperetina (fig. 1c).

En la fig. 2 se puede ver, por un lado, que el nivel de hesperetina (fig. 1c) en plasma tras la ingestión de hesperetín-7-glucósido (fig. 1b) presenta un pico agudo poco después de la ingestión. Con independencia de la teoría se piensa que ello es debido a la presencia de enzimas capaces de escindir el fragmento de glucosa, por lo cual la hesperetina es fácilmente absorbible.

Por otra parte el nivel de hesperetina en plasma resultante de la ingestión de hesperidina (fig. 1a) solo aparece más tarde y en menor medida. Con independencia de la teoría se piensa que ello es debido a la presencia de enzimas capaces de escindir el fragmento de rutinosa de la hesperidina solamente en un estadio posterior del paso a través del tracto gastrointestinal.

Así, las composiciones usadas como referencia proporcionan ventajosamente un nivel de hesperetina en plasma que se mantiene durante un periodo más largo de tiempo (véase fig. 2).

Además, conforme a una forma de ejecución de referencia, dicho nivel sostenido de hesperetina en plasma también lo proporcionan composiciones que llevan una mezcla de hesperidina (fig. 1a) y hesperetín-7-glucósido (fig. 1b), preferiblemente en una relación de hesperidina a hesperetín-7-glucósido comprendida entre 70/30 y 50/50.

La cantidad de flavonoide en las composiciones usadas como referencia es la correspondiente a una proporción de 0,01 mg hasta 1 g del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide. Preferiblemente el flavonoide está presente en una proporción de 10 mg hasta 800 mg del equivalente de aglicona del compuesto flavonoide.

Por ejemplo, cuando en una composición de referencia se usa hesperidina (fig. 1a), ésta se halla en una proporción que aporta 0,01 mg hasta 1 g, preferiblemente 10 mg hasta 800 mg, de la correspondiente hesperetina (fig. 1c), lo cual es fácil de calcular por un especialista en la materia.

En las composiciones usadas como referencia la α-ramnosidasa puede hallarse en una cantidad suficiente para aportar el 10-50% del flavonoide aglicona o de una forma de flavonoide glicosilado que es absorbible en las fases tempranas de la digestión.

Por ejemplo, cuando el flavonoide es hesperidina se usa una cantidad de α-ramnosidasa suficiente para aportar el 10-50% de hesperetín-7-glucósido (fig. 1b) o de hesperetina (fig. 1c) en el tracto gastrointestinal superior (intestino delgado), lo cual se puede medir fácilmente empleando métodos conocidos del estado técnico tales como ensayos con TIM-1 de TNO y confirmación *in vivo* (véanse figs. 8 y 9).

Las composiciones utilizadas como referencia se formulan preferiblemente para emplearlas como composiciones nutricionales, farmacéuticas o cosméticas.

Por consiguiente las composiciones utilizadas como referencia pueden ser secas, húmedas o semihúmedas. Se entiende por “secas” las composiciones que tienen una actividad acuosa inferior a 0,6. Por “semihúmedas” las que tienen una actividad acuosa entre 0,6 y 0,9, y por “húmedas” las que tienen una actividad acuosa superior a 0,9.

Se pueden elegir entre composiciones líquidas, secas o semisecas tales como soluciones, espráis, polvos, tabletas, cápsulas, yogur, galletas, leche, bebidas, chocolate, helados, copos o barras de cereales para el desayuno, leches en polvo, productos a base de soja, productos lácteos no fermentados, suplementos nutricionales, suplementos alimenticios, comida para mascotas, fórmulas infantiles, etc.

Para la ingestión de composiciones orales y en particular de suplementos alimenticios son posibles muchas formas de ejecución. Se formulan mediante los medios usuales para producir tabletas recubiertas de azúcar, cápsulas de gelatina, geles, emulsiones, tabletas, cápsulas o soluciones. En particular los flavonoides que contienen ramnosa y la α-ramnosidasa o, en una forma de ejecución diferente, la hesperidina y el hesperetín-7-glucósido se pueden incorporar a cualesquiera otras formas de suplementos alimenticios o de alimentos enriquecidos, como por ejemplo barras alimenticias, o a productos en polvo compactados o no. Los polvos se pueden diluir con agua, en una bebida gaseosa, en productos lácteos o en productos derivados de soja o se pueden incorporar a barras alimenticias.

Las composiciones pueden comprender los excipientes y componentes habituales, p.ej. componentes grasos y/o acuosos, agentes humectantes, espesantes, conservantes, texturizantes, agentes saborizantes y/o antioxidantes, colorantes usuales en el sector alimenticio.

Según otro aspecto de referencia se puede usar α-ramnosidasa en la preparación de una composición que incluya al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y en la cual la α-ramnosidasa se halle en un estado básicamente incapaz de cortar el fragmento de ramnosa de dicho flavonoide, a fin de mejorar su bioeficacia y/o biodisponibilidad. Se entiende por “composición” cualquiera que sea conforme a la presente invención, tal como se ha descrito arriba.

La bioeficacia se define como la proporción del nutriente ingerido convertida en una forma activa del nutriente que tiene un efecto biológico significativo. Está muy relacionada con la biodisponibilidad, la cual se define como el grado de absorción de una sustancia hacia la circulación sistémica. Mejorando la bioeficacia y/o la biodisponibilidad de un flavonoide, la presente invención proporciona la ventaja de una composición más efectiva, cuyos efectos son más duraderos y sostenidos.

Así, como referencia, se ofrece un método para mantener y/o mejorar la biodisponibilidad de los flavonoides que llevan ramnosa, el cual comprende la etapa de preparar una composición que contenga al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α-ramnosidasa, de modo que dicha α-ramnosidasa se encuentre en un estado básicamente incapaz de cortar el fragmento de ramnosa de dicho flavonoide.

Una comparación de los niveles en plasma tras la ingestión de hesperidina (fig. 1a) o tras la ingestión de hesperetín-7-glucósido (fig. 1b) muestra una diferencia notable respecto a las composiciones de la presente invención. De hecho, tras la ingestión de las composiciones usadas como referencia, los niveles de hesperetina en plasma se mantienen durante un periodo de tiempo prolongado (fig. 2).

Así, como referencia, se describe un método para prolongar los niveles en plasma de los metabolitos de flavonoides que contienen ramnosa tras la ingestión de dichos flavonoides, el cual comprende la etapa de proporcionar una composición por vía oral que contiene al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α-ramnosidasa, de modo que dicha α-ramnosidasa se encuentra en un estado básicamente incapaz de cortar el fragmento de ramnosa de dicho flavonoide.

En los métodos usados como referencia la α-ramnosidasa se puede aportar separadamente de la composición que lleva el flavonoide con contenido de ramnosa. Por ejemplo, dicha α-ramnosidasa se puede suministrar en forma de tableta, cápsula, etc., para ingerir al mismo tiempo que la composición que lleva el flavonoide. Como alternativa se puede suministrar por ejemplo en forma de polvo para esparcir sobre la composición que contiene el flavonoide. La persona experta en la materia puede imaginar enseguida varias alternativas a las formas de ejecución específicas aquí mencionadas.

En otro aspecto de referencia las composiciones según la presente invención pueden tener un uso cosmético. Se entiende por “uso cosmético” un empleo no terapéutico que pueda mejorar la apariencia estética o el confort de la piel, del pelaje y/o del cabello de humanos o mascotas.

En este contexto el uso cosmético puede incluir la prevención de daños y/o la mejoría de la piel, del pelaje y/o del cabello de humanos o mascotas. Estos daños incluyen en particular lesiones actínicas y envejecimiento de la piel, por ejemplo sequedad, pigmentación irregular (sobre todo pecas, lentigo, hipomelanosis guttata e hiperpigmentación persistente), arrugas (especialmente líneas finas superficiales y surcos profundos), pseudocicatrices estrelladas, elastosis, inelasticidad, telangiectasia, lagos venosos, comedones, hiperplasia sebácea, acrocordón y queratosis seborreica.

El uso cosmético también puede tener efectos beneficiosos particulares en el cabello y el pelaje, como por ejemplo mejor densidad del cabello o pelaje, mayor diámetro de las fibras, mejor color, untuosidad, lustre, producción de sebo, y ayudar a prevenir la pérdida de cabello o pelaje.

Como referencia se mencionan usos terapéuticos como por ejemplo los dermatológicos. De hecho el empleo de α-ramnosidasa y de al menos un flavonoide que contenga ramnosa - con la α-ramnosidasa en un estado básicamente incapaz de escindir dicho flavonoide – en la preparación de composiciones para mejorar la salud cutánea constituye otro aspecto de la presente invención. Dichas composiciones también se pueden usar para prevenir inflamaciones o para mejorar la salud ósea y/o cardiovascular. El término “composición” incluye cualquiera que sea conforme a la presente invención, tal como se ha descrito arriba.

En esta forma de ejecución las composiciones según la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir lesiones cutáneas producidas, por ejemplo, por una situación de estrés, p.ej. de tipo químico, biológico o físico, p.ej. por exposición a agentes oxidantes o carcinógenos, a bacterias, a virus, a hongos, a lípidos procedentes de células circundantes y/o a microbios o a la radiación UV.

Estas lesiones incluyen además queratosis actínicas, púrpura, angioma cereza, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, quemazón y/o ampollas en la piel, hiperplasia epidérmica, inflamación, supresión inmunitaria y cáncer, p.ej. cánceres cutáneos no melanoma y melanoma.

El efecto de las composiciones utilizadas como referencia en la piel de humanos o mascotas se puede medir por métodos convencionales, incluyendo dosis epistémica mínima (DEM), colorimetría, pérdida de agua transepidérmica, reparación del ADN, medición de la producción de interleucinas y proteoglicanos o de la actividad de colagenasa, de la función de barrera o de la renovación celular.

Por tanto se cita como referencia un método para mejorar la salud cutánea, el cual incluye la administración oral de una composición que lleva al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α-ramnosidasa, o la administración oral simultánea, por separado, de una composición que lleva al menos un flavonoide con contenido de ramnosa y α-ramnosidasa, con dicha α-ramnosidasa en un estado básicamente incapaz de escindir el fragmento de ramnosa de dicho flavonoide. Este método también sirve para mejorar la salud cardiovascular y la salud ósea.

La presente invención se ilustra con más detalle mediante los ejemplos no limitativos descritos a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1 (referencia)

Materiales

Hesperidinasa “Amano” Conc. (A. MANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

Escisión de hesperidina *in vitro* mediante extractos bacterianos crudos

Para comprobar si las alfa- ramnosidasas bacterianas pueden reconocer y escindir hesperidina como substrato, los extractos crudos de las células cultivadas en presencia de ramnosa se incuban con hesperidina a pH 4 y a pH 6 durante 4 horas y 8 horas y el análisis se realiza por HPLC. Los resultados se muestran en la tabla siguiente como porcentaje de hesperidina o sus derivados respecto a las cantidades totales de hesperidina al inicio de la reacción (0,08 mg/ml). Los ensayos se efectuaron con 0,08 mg de hesperidina/ml - que es la concentración aproximada de hesperidina pretendida para el producto final – y extractos crudos de 3 x 10^9 bacterias/ml.

Los resultados demuestran que las dos cepas tienen actividad α-ramnosidasa y β-glucosidasa y que por lo tanto dividen la hesperidina en hesperetín-7-glucósido y aglicona en diferentes medidas, dependiendo de las condiciones de reacción. Los resultados sugieren que las bacterias se pueden emplear para transformar parcialmente *in situ* hesperidina en hesperetín-7-glucósido y aglicona.

%		**Recuento bacteriano**	**Hesperidina**		**Hesperetín-7-glucósido**		**Aglicona**	
			4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h
Control (-) (sin enzymas)	pH 4 pH 6	-	nd nd	95 95	nd nd	0 0	nd nd	0 0
Control (+) pH4 (hesperedinasa) pH6	pH 4 pH 6	-	0 66	0 49	92 25	93 40	0 0	0 0
			4 h	8 h	4 h	8 h	4 h	8 h
***L. acidophilus* NCC 3010**	pH 4 pH 6	3,4 x 10^9	18 26	5 10	28 6	18 5	26 13	42 27
***L. plantarum* NCC1313**	pH 4 pH 6	3,4 x 10^9	12 9	8 0	5 5	4 0	62 25	66 33
Nd: no determinado								

Ejemplo 2

Se mezclan 0,2 a 50 mg de hesperidina/g de producto con 10^7-10^{10} ufc/(g de producto) de bacterias con actividad alfa-ramnosidasa. La mezcla resultante se combina con un vehículo adecuado. Los vehículos se pueden elegir entre leche fermentada, yogur, queso fresco, leche cuajada, barritas dulces, copos o barras de cereales para el desayuno, bebidas, leche en polvo, productos a base de soja, productos lácteos no fermentados.

REIVINDICACIONES

1. Bacteria con actividad α-ramnosidasa, que es *Lactobacillus gasseri*.

2. Bacteria según la reivindicación 1, que es *Lactobacillus gasseri CNCMI-3795*.

3. Uso de una bacteria para producir α-ramnosidasa, que es *Lactobacillus gasseri*.

4. Uso según la reivindicación 3, en que la bacteria es *Lactobacillus gasseri CNCMI-3795*.

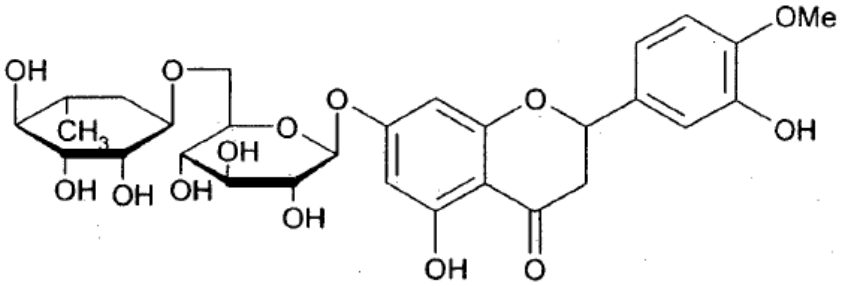

Figura 1a

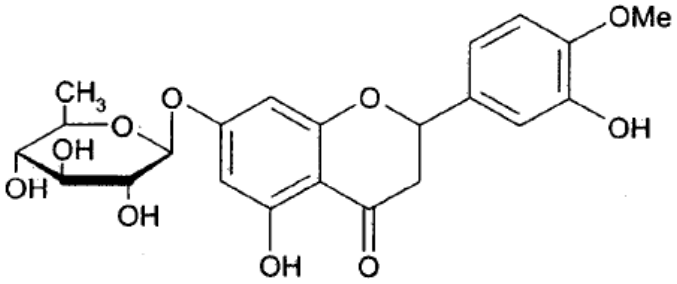

Figura 1b

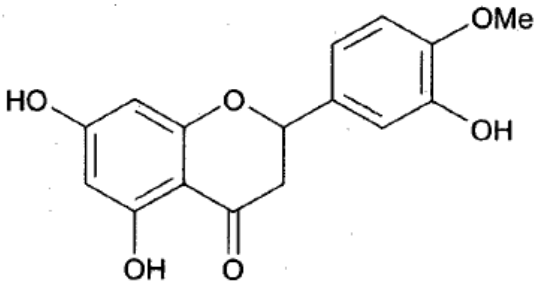

Figura 1c

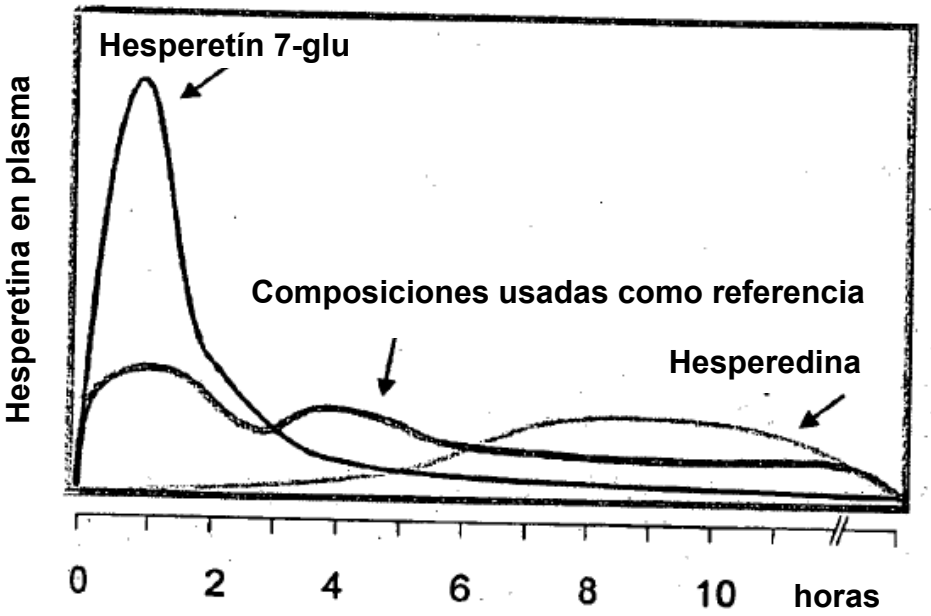

Figura 2 (referencia)

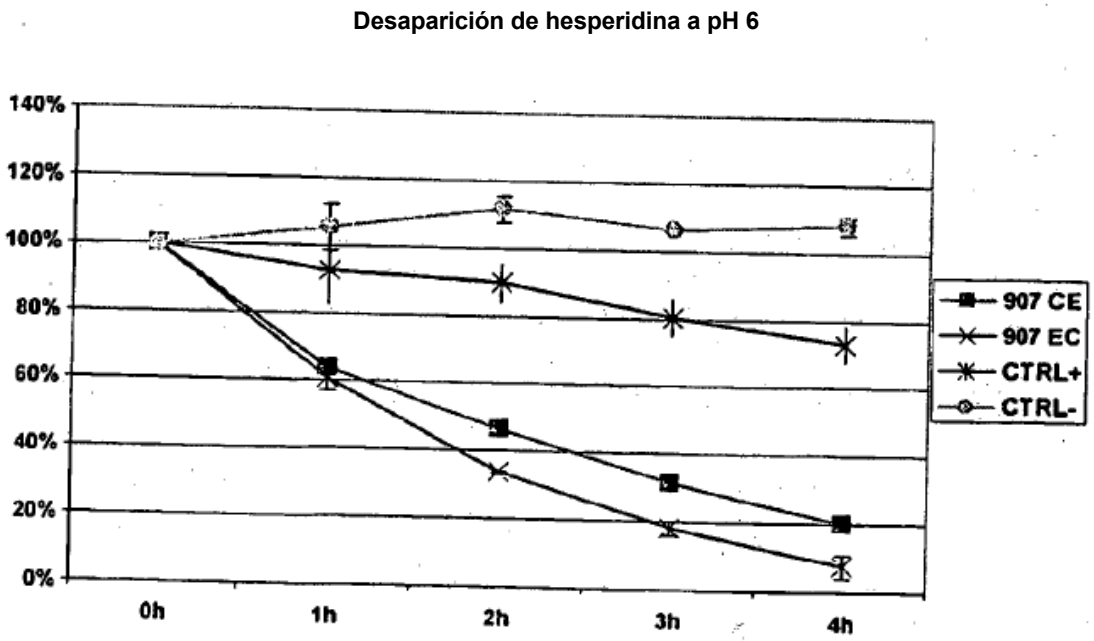

Figura 3

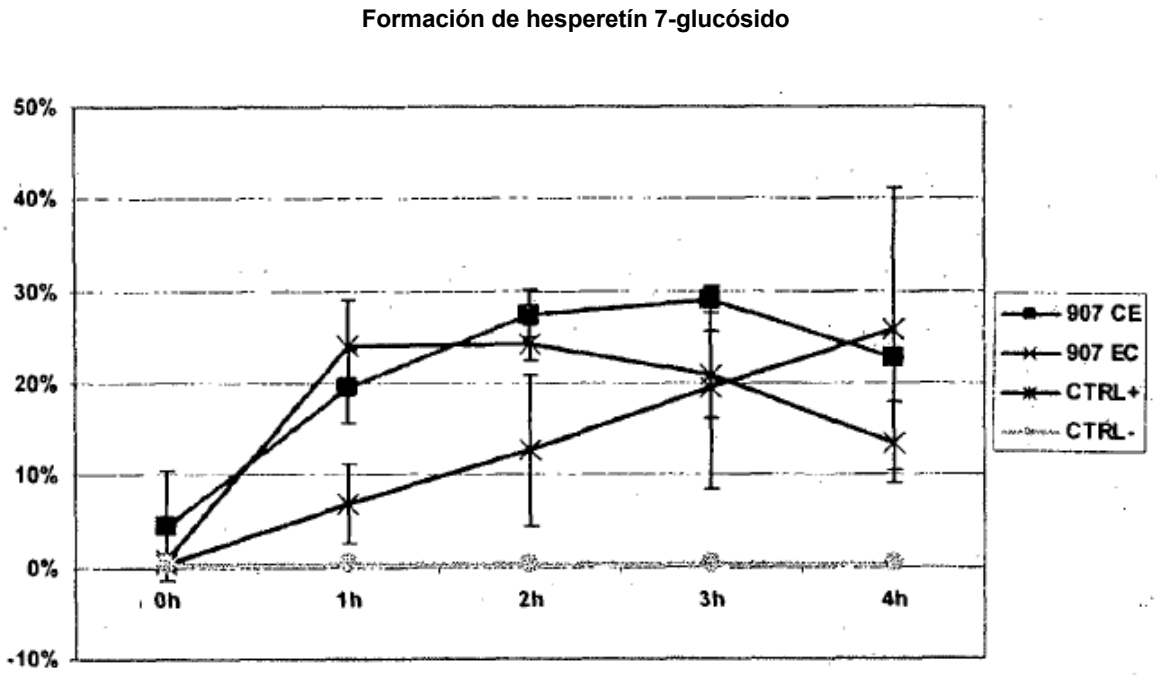

Figura 4

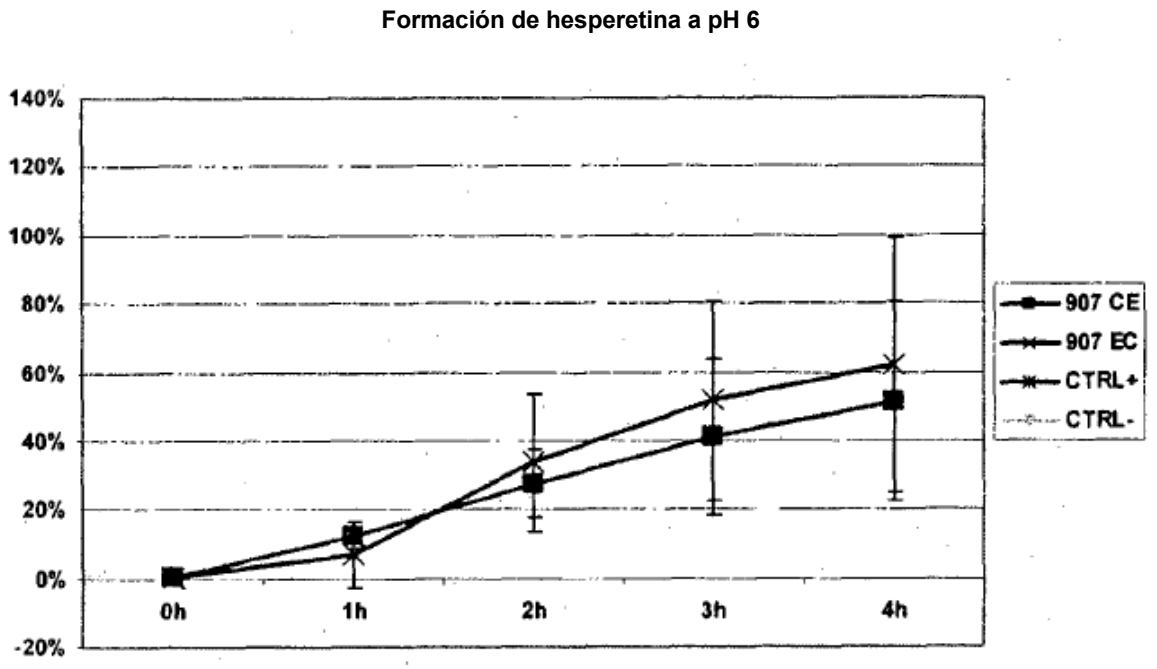

Figura 5

Desaparición de hesperidina a pH 4

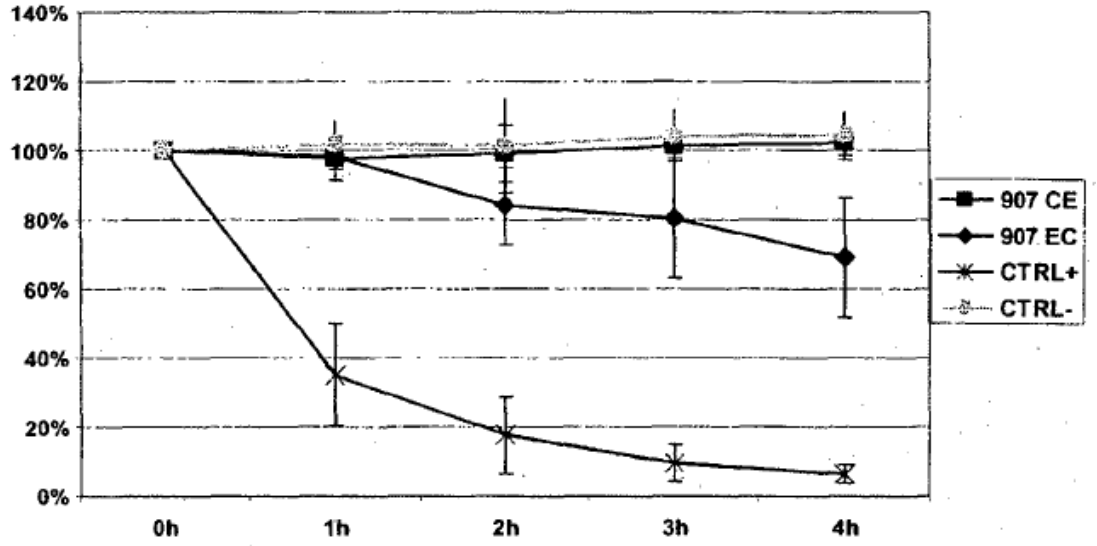

Figura 6

Formación de hesperetín 7-glucósido a pH 4

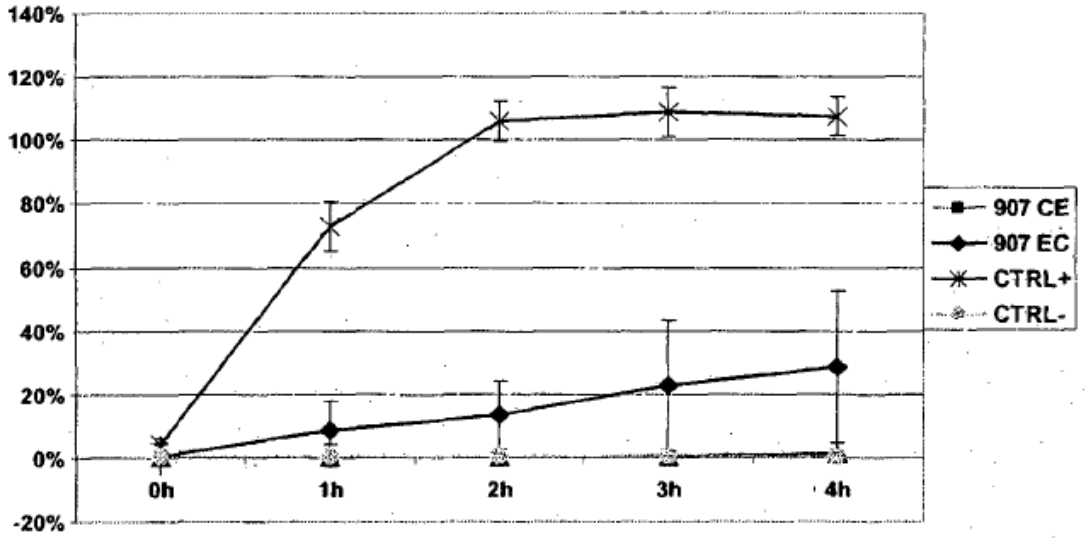

Figura 7

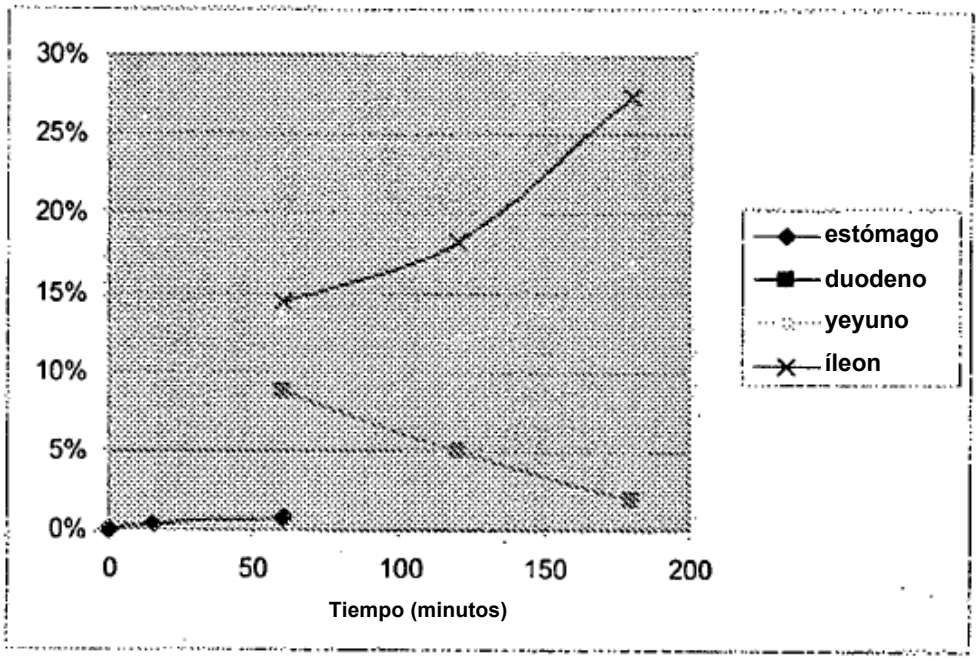

Figura 8

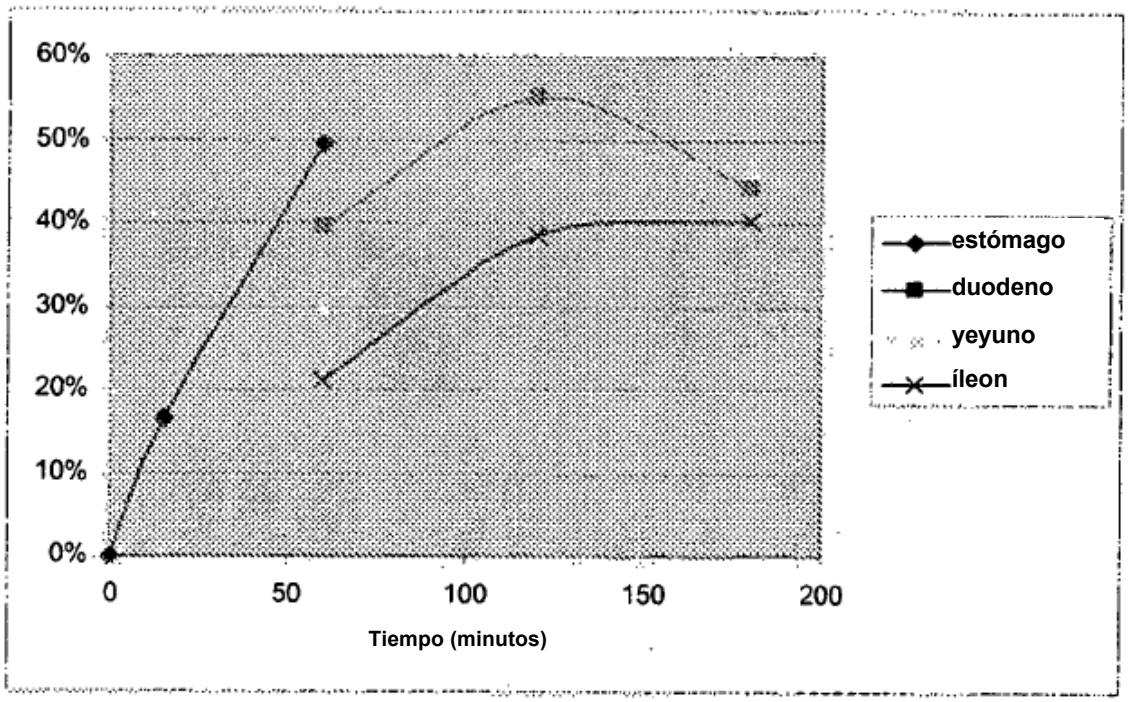

Figura 9