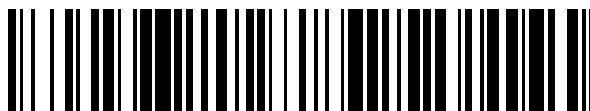


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 094**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2007 PCT/EP2007/053873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2007 WO07122187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2007 E 07728332 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2010200**

54 Título: **Utilización de polisacáridos de origen fúngico como composición farmacéutica o suplementos alimenticios**

30 Prioridad:

21.04.2006 FR 0651415

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

25.10.2017

73 Titular/es:

**KITOZYME S.A. (100.0%)
PARC INDUSTRIEL DES HAUTS SARTS, ZONE II,
RUE HAUTECLAIRE 4
4040 HERSTAL, BE**

72 Inventor/es:

**TEISSEDRE, PIERRE-LOUIS;
BORNET, AURÉLIE;
GAUTIER, SANDRINE;
BRUYERE, JEAN-MICHEL y
ROUANET, JEAN-MAX**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 639 094 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 polisacáridos de origen fúngico como composición farmacéutica o suplementos alimenticios

- 5 **[0001]** La invención se refiere a la utilización de polisacáridos de origen fúngico como composición farmacéutica o suplementos alimenticios para la salud humana o animal.

Estado de la técnica

- 10 **[0002]** Es conocido que los hongos, tanto microscópicos como comestibles, presentan propiedades beneficiosas para la salud, tales como hipoglucémica, hipocolesterolemiante, antioxidante, inmunoestimulante. Los hongos contienen compuestos digestibles que tienen propiedades importantes en la salud del tracto gastrointestinal y del cuerpo en general, definidos como fibras alimentarias de tipo polisacárido. Estos presentan la propiedad de actuar sobre la circulación de glucosa rebajando la concentración sanguínea de insulina, aumentan la viscosidad de los alimentos en el intestino delgado y ralentizan la absorción de los glúcidos. Poseen, por lo tanto, la capacidad de regular el metabolismo de los azúcares. También desempeñan un papel en la regulación de la tensión arterial. Los hongos que contienen cantidades importantes de fibras tienen un efecto beneficioso sobre la reducción de la concentración de colesterol total, y de HDL-colesterol a nivel sanguíneo, como se muestra mediante un estudio de Fukushima y col. (2000) sobre fibras del hongo *Agaricus bisporus* (Fukushima M, Nakano M, Morii Y, Ohashi T, Fujiwara Y & Sonoyama K (2000) J. Nutr. 130:2151). Desempeñan, por lo tanto, un papel indirecto en la prevención de la hipertensión, de las enfermedades cardiovasculares, y más ampliamente sobre la obesidad y el síndrome metabólico.

- 25 **[0003]** Muy pocos alimentos ejercen propiedades inmunoestimulantes. En su mayor parte, los productos alimentarios inducen más bien una inmunodepresión. Hongos como el shiitake (*Lentinus edodes*), el maitake (*Grifola frondosa*), el reishi (*Ganoderma lucidum*) o el ABM (*Agaricus blazei murill*) son alimentos llamados inmunoestimulantes. La función inmunoestimulante se atribuye ampliamente a la presencia de los polisacáridos de tipo beta-glucano presentes en sus paredes celulares (Lull C, Wichers HJ & Savelkoul HFJ (2005) Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators Inflammation 2:63).

- 30 **[0004]** Ciertas fibras vegetales están recomendadas para prevenir, inhibir o tratar la obesidad y las enfermedades asociadas a la obesidad, como por ejemplo las oligofruktosas derivadas de inulina de achicoria, o la laminarina, un beta-glucano derivado de las algas. Las oligofruktosas actúan fermentando a nivel del colon, liberando, de este modo, compuestos capaces de suprimir el contenido plasmático de grelina, una hormona que estimula habitualmente el apetito. Indirectamente, aumentando la saciedad y reduciendo la ingesta de alimentos, se observa un efecto sobre la tasa de colesterol y la aterosclerosis, entre los numerosos efectos asociados al síndrome metabólico y a las enfermedades cardiovasculares.

- 40 **[0005]** La quitosana, un polisacárido derivado tradicionalmente de la quitina de los caparazones de crustáceos y considerado como una fibra, también es conocido por ejercer una acción hipolipidemiante e hipocolesterolemiante. Estos efectos se atribuyen a un mecanismo de interacción entre los ácidos grasos de la dieta a nivel del estómago o los ácidos biliares (cargados negativamente) con la quitosana que está cargada positivamente. La quitosana presenta, no obstante, el inconveniente de su fuente crustácea, potencialmente alergizante.

- 45 **[0006]** Los usos no alimentarios de composiciones que contienen el copolímero de quitina-glucano son conocidos, en particular como activo cicatrizante de la piel. Las composiciones Mycoton y Mycoran derivadas de *Aspergillus niger* se describen por sus propiedades por aplicación sobre la piel y sobre las cicatrices. No obstante, no se conoce ninguna aplicación por vía oral, en particular en el ámbito alimentario o farmacéutico.

- 50 **[0007]** La mayor parte de los estudios realizados sobre los efectos beneficiosos de las fibras de origen fúngico han sido realizados en hongos frescos, bien en hongos en polvo, o bien en los beta-glucanos solubles en medio acuoso extraídos generalmente de plantas. Estos productos no son, no obstante, los más adaptados a las indicaciones mencionadas anteriormente. El documento WO0135944 describe la utilización de la quitosana (polisacárido de origen fúngico) para el tratamiento, entre otras, de la aterosclerosis, la hipercolesterolemia, dislipidemia, hiperlipidemia y obesidad. La quitosana utilizada es un derivado desacetilado de la quitina.

Objetivos de la invención

[0008] En su alcance más amplio, la presente invención se refiere a objetos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas. La invención tiene como objetivo principal proporcionar una familia de sustancias naturales de origen fúngico que permite proporcionar un suplemento alimenticio o una composición farmacéutica, concretamente para mejorar la salud humana y animal como complemento de una alimentación equilibrada y de buenas prácticas de higiene, concretamente en la prevención y/o la lucha contra patologías tales como el síndrome metabólico, la obesidad, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares, o las enfermedades asociadas.

[0009] La presente invención también tiene como objetivo proporcionar una familia de sustancias que presenta una seguridad alimentaria irreprochable, al tiempo que está fácilmente disponible en gran volumen a un coste compatible con el uso como suplementos alimenticios. La descripción también tiene como objetivo proporcionar una familia de sustancias naturales de origen no animal, de excelente pureza, bien caracterizadas y con una buena trazabilidad.

[0010] La descripción también tiene como objetivo proporcionar un suplemento alimenticio, de tipo polisacárido, estable y fácil de formular.

[0011] La invención tiene como objetivo proponer un activo farmacéutico o suplemento alimenticio que permite llevar los parámetros asociados a las patologías del síndrome metabólico, de la obesidad, de la diabetes y/o de las enfermedades cardiovasculares a su nivel normal, como, a modo de ejemplo el contenido de triglicéridos, el equilibrio entre el LDL- y el HDL-colesterol, la superficie del arco aórtico recubierta de depósitos lipídicos, la capacidad antioxidante del plasma, etc.

Descripción de la invención

[0012] La presente invención describe los efectos del extracto, ventajosamente purificado, de fuente fúngica, y preferentemente de *Aspergillus niger*. Los hidrolizados de los extractos purificados, es decir los copolímeros de quitina y beta-glucano de masa molecular inferior, forman también parte de la invención. Es la asociación entre los dos polímeros (quitina y beta-glucano) y la arquitectura tridimensional del copolímero derivado de la fuente fúngica las que hacen de él un compuesto beneficioso para la salud. La disponibilidad y la calidad en particular de *Aspergillus niger*, que es un coproducto de la producción de ácido cítrico destinado a la industria alimentaria y farmacéutica, hacen de él una materia prima preferente para los usos en salud humana y animal de sus derivados.

[0013] Fibras de tipo polisacárido y sus oligómeros de orígenes diversos también son conocidos por sus acciones beneficiosas, como las oligofruktosas, la laminarina, la quitosana. Los inventores de la presente invención ya habían descrito un procedimiento de producción de quitosana de origen no animal, a partir de recursos fúngicos, y más particularmente a partir de un hongo de tipo *Aspergillus niger* en la solicitud internacional WO 03/068824.

[0014] Ahora bien, los inventores han descubierto de manera sorprendente que el compuesto quitina-glucano derivado de fuentes de hongos mencionadas anteriormente, y en particular del hongo *Aspergillus niger*, y sus hidrolizados combinan de manera sorprendente varias de las propiedades de las fibras conocidas, y que la quitosana no es el compuesto más indicado para paliar las dislipidemias, por ejemplo. En efecto, el compuesto quitina-glucano y sus hidrolizados ejercen a la vez efectos hipocolesterolemiantes, hipoglucémicos, aumentan la capacidad antioxidante del plasma, favoreciendo de este modo la disminución de la placa de ateroma, favorecen la saciedad y estimulan el sistema inmunitario.

[0015] En lo que concierne a la quitosana, consta a priori que su acción calmante se ejerce por su capacidad para unirse a los lípidos a nivel gástrico, y que su acción hipocolesterolemiantes por su capacidad para unirse a los lípidos a nivel intestinal, mediante interacciones electrostáticas entre los ácidos grasos o biliares y los grupos amonio de la quitosana. Ahora bien, las sustancias quitina-glucano y sus hidrolizados de la invención no presentan, por un lado, esencialmente ninguna carga electrostática, y por otro lado no son capaces de captar los ácidos grasos *in vitro*. Sin embargo, presentan una acción reductora significativa del contenido de triglicéridos, del contenido de colesterol total y de LDL-colesterol equivalente al de la quitosana, al tiempo que favorece el aumento del HDL-colesterol de manera equivalente a la de la quitosana.

[0016] A estas acciones comunes se añaden efectos no descritos con la quitosana, que hacen de estas, sustancias ventajosas: la quitina-glucano y sus hidrolizados son capaces de absorber generalmente aproximadamente 10 veces su masa en agua, lo que hace de estas sustancias con buenas propiedades de fibras capaces concretamente de mejorar el tránsito. Son capaces de estimular una actividad antioxidante del plasma de manera significativa, y de ejercer una actividad inmunoestimulante debida a la sinergia entre la parte de quitina y la

parte de beta-glucano.

[0017] Al no ser capaces de captar los lípidos a nivel gástrico, la quitina-glucano y sus hidrolizados no conllevan los riesgos de desequilibrio de nutrientes lipófilos (vitaminas) como se sospecha a veces para la
5 quitosana. Finalmente, la quitina-glucano y sus hidrolizados se obtienen y se purifican según un procedimiento fácil, a partir de fuentes fúngicas de excelente calidad, que son co-productos disponibles en gran cantidad y renovable, y que no son de origen animal.

[0018] Los inventores entienden por «polisacáridos de origen fúngico» los extractos purificados de paredes
10 celulares de hongos compuestos mayoritariamente por polisacáridos de quitina y de beta-glucano, en forma de copolímeros, y sus hidrolizados. Los extractos purificados comprenden un contenido preferentemente de quitina-glucano superior al 70 % en masa con respecto a la masa total del extracto, preferentemente superior al 80 %, preferentemente superior al 85 % y más preferentemente superior al 95 %.

[0019] Los inventores entienden por «quitina-glucano» un copolímero puro extraído de las paredes celulares
15 de hongos que está constituido por eslabones de unidades N-acetil-D-glucosamina y opcionalmente por una proporción minoritaria de las unidades D-glucosamina unidas entre sí mediante enlaces de tipo (1,6) de conformación alfa (eslabón de quitina), y por eslabones de las unidades D-glucosa unidas entre sí mediante enlaces de tipo (1,3), o (1,3)(1,6), o (1,3)(1,4) y preferentemente (1,3), de conformación beta (eslabón beta-glucano,
20 denominados en este contexto «glucano»).

[0020] Está admitido generalmente que los polisacáridos de las paredes celulares de los hongos están
separados en dos grupos según su solubilidad en medio alcalino, y que el esqueleto de las paredes celulares es insoluble. También es conocido que la fracción insoluble está constituida por quitina y por beta-glucanos, en
25 proporciones variables según las especies, que las unidades de beta-glucano están unidas por eslabones de estructura variable, y que la unión entre la quitina y los beta-glucanos es estable como es mostrado por ejemplo por Siestma & Wessels para *Saccharomyces cerevisiae* (Zigomiceto), *Neurospora crassa* (Ascomiceto), *Aspergillus nidulans* (Ascomiceto) y *Coprinus cinereus* (Basidiomiceto) (Siestma JH & Wessels JG. (1981) Solubility of (1,3)-beta-D-(1,6)-beta-D-glucan in fungal walls: importance of presumed linkage between glucan and chitin. (1981) J.
30 Gen. Microbiol. 125:209). Es conocido que los eslabones de quitina y beta-glucano de la fracción insoluble de *Aspergillus niger* están unidos entre sí de manera covalente, como mencionan, por ejemplo, Stagg CM y Feather MS (Biochim. Biophys. (1973) Acta 320: 64). Métodos de determinación de la naturaleza del enlace covalente entre la quitina y los beta-glucanos han sido descritos por ejemplo por Fontaine y col., para *Aspergillus fumigatus* (Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, Vorgias CE, Diaquin M & Latgé JP. (2000) Molecular
35 organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall, J. Bio. Chem. 275:27594), y por Kollar y col., para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Kollar R, Petrakovas E, Ashwell G, Robbins P & Cabib E. (1995) Architecture of the yeast cell wall, the linkage between chitin and beta(1,3)glucan, J. Biol. Chem. 270:1170).

[0021] Ventajosamente el copolímero de quitina-glucano contiene menos del 10 % de compuestos solubles
40 en agua. Preferentemente, el copolímero de quitina-glucanos tiene una pureza superior al 80 %, y preferentemente superior al 85 %. Ventajosamente, el copolímero de quitina-glucanos contiene menos de 40 mg/kg de metales pesados, tal como se determina mediante el método descrito en la Farmacopea Europea (monografía 2.4.8F), y ventajosamente menos de 20 mg/kg de metales pesados. Ventajosamente, el copolímero de quitina-glucano contiene menos de 2 ppm de arsénico, como se determina mediante AES-ICP. Ventajosamente, el quitina-glucano
45 tiene una calidad microbiológica adaptada a la utilización alimentaria, y preferentemente contiene menos de 10.000 ufc/g, y preferentemente menos de 1.000 ufc/g, para el recuento total de microorganismos, incluyendo las levaduras y mohos.

[0022] La relación entre la quitina y el beta-glucano está comprendida entre 95:5 y 5:95, preferentemente
50 entre 70:30 y 20:80, y más preferentemente entre 70:30 y 25:75, y más preferentemente entre 60:40 y 25:75 (m/m). Otra relación entre la quitina y el beta-glucano preferido está comprendida entre 50:50 y 10:90, preferentemente entre 45:55 y 20:80. Este tipo de copolímero puede obtenerse mediante hidrólisis del copolímero de quitina-glucano descrito anteriormente. La parte de quitina del copolímero de quitina-glucano está compuesta preferentemente por, como mínimo, un 85 % de unidades de N-acetil-D-glucosamina y por, como máximo, un 15 % de unidades de D-
55 glucosamina, preferentemente por, como mínimo, un 90 % de unidades de N-acetil-D-glucosamina y por, como máximo, un 10 % de unidades de D-glucosamina. El copolímero se presenta generalmente en forma de un polvo blanco a ligeramente marrón. Es esencialmente insoluble en los disolventes acuosos y orgánicos sean cuales sean la temperatura y el pH. Es capaz de hincharse en los medios acuosos. Es higroscópico, que puede absorber, generalmente, aproximadamente 7 veces su masa en agua, lo que corresponde a la capacidad de hinchado de las

fibras vegetales insolubles como la hemicelulosa o la pectina.

5 **[0023]** Ventajosamente, los copolímeros de quitina-glucano utilizados en la presente invención se obtienen mediante el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 03/068824 y la solicitud de patente francesa FR 0507066 depositada a nombre de KITOZYME S.A., respectivamente el 12 de febrero de 2003 y el 4 de julio de 2005. Este procedimiento se describe en particular en la solicitud FR 0507066 páginas 18, línea 14, y siguientes de la solicitud tal como se depositó. En este procedimiento se utiliza preferentemente *Aspergillus niger* como fuente fúngica.

10 **[0024]** Un procedimiento preferido comprende las etapas siguientes:

- 1) opcionalmente suspender la biomasa en una solución ácida y retirar los productos solubles en el medio ácido,
- 2) suspender con la fracción insoluble en medio ácido en una solución alcalina y retirar los compuestos solubles en medio alcalino,
- 15 3) purificar el producto insoluble en medio alcalino mediante un tratamiento suplementario con agua,
- 4) secar el producto insoluble en agua,
- 5) opcionalmente purificar el producto secado mediante un tratamiento con un disolvente orgánico,
- 6) secar el producto insoluble en medio orgánico.

20 **[0025]** La primera etapa de suspensión de la biomasa en una solución ácida es opcional. Esta depende de la composición de la biomasa inicial y de la pureza requerida para el producto copolímero de quitina-glucano final. La solución ácida es, preferentemente, una solución acuosa de ácido clorhídrico o de ácido sulfúrico, y preferentemente de ácido clorhídrico. Según una realización particular, la solución ácida tiene una concentración comprendida entre 0,1 y 5 N, y preferentemente de aproximadamente 0,5 N.

25 **[0026]** La primera etapa de extracción permite ventajosamente eliminar los compuestos solubles en medio ácido, incluyendo los compuestos inorgánicos.

30 **[0027]** La segunda etapa emplea ventajosamente una solución acuosa como una solución acuosa de hidróxido de sodio, de hidróxido de potasio o de hidróxido de amonio, y preferentemente hidróxido de potasio o de sodio. Según una realización preferida, la solución básica tiene una concentración comprendida entre 0,1 y 5 N, y preferentemente de aproximadamente 1 N.

35 **[0028]** La tercera etapa de purificación del producto insoluble en medio alcalino se realiza ventajosamente mediante puesta en contacto de esta fracción con agua y separación de los productos insolubles en agua por filtración.

40 **[0029]** Cada etapa puede realizarse a una temperatura preferentemente comprendida entre 5 y 120 °C y preferentemente a una temperatura inferior a 60 °C. La biomasa está comprendida preferentemente entre el 1 y el 15 % (en masa seca, m/v), y más preferentemente entre el 3 y el 12 %. Las primera y segunda etapas duran preferentemente entre 4 y 48 horas, y preferentemente menos de 30 horas. Cada etapa puede repetirse varias veces.

45 **[0030]** Cada etapa puede repetirse varias veces.

[0031] Los inventores entienden por «hidrolizados de quitina-glucano» los copolímeros resultantes de la hidrólisis controlada del copolímero de quitina-glucano extraído concretamente de paredes celulares de hongos, que están también constituidos por eslabones de quitina y por eslabones de beta-glucano, enlazados de manera covalente, con la relación entre la quitina y los beta-glucanos preferentemente comprendida entre 50:50 y 10:90
50 (m/m), preferentemente entre 60:40 y 15:85 (m/m). Los hidrolizados presentan una masa molecular inferior a la del copolímero de quitina-glucano, resultante de una hidrólisis parcial. La parte de quitina de los hidrolizados de quitina-glucano está compuesta preferentemente por, como mínimo, un 85 % de unidades de N-acetil-D-glucosamina y por, como máximo, un 15 % de unidades de D-glucosamina, preferentemente, como mínimo, un 90 % de unidades de N-acetil-D-glucosamina y por, como máximo, un 10 % de unidades de D-glucosamina.

55 **Descripción detallada de la invención**

[0032] Los inventores han descubierto de manera sorprendente que un copolímero de quitina-glucano y sus hidrolizados que pertenecen a una familia de polisacáridos de una estructura cercana a la de la quitosana, presentan

propiedades hipocolesterolemiantes equivalentes a las de la quitosana, aunque no esté esencialmente cargada. Este compuesto se obtiene fácilmente a partir de fuentes fúngicas, como por ejemplo de micelio de *Aspergillus niger*, del cual constituye la parte insoluble del exoesqueleto de las paredes celulares. El copolímero de quitina-glucano y sus hidrolizados presentan también otros efectos beneficiosos para la salud, descritos en la presente invención.

5

[0033] La invención se refiere en particular a la utilización de polisacáridos extraídos de fuentes fúngicas y sus derivados hidrolizados como activos farmacéuticos o suplementos alimenticios para mejorar la salud humana y animal. La administración oral regular de los polisacáridos de la invención permite en particular prevenir, tratar o luchar contra concretamente la dislipidemia, la hipercolesterolemia, una aterosclerosis y estimular las actividades antioxidantes del organismo, estimular el sistema inmunitario, ejercer una acción hipoglucémica favorable en los casos de diabetes, y favorecer la saciedad para minimizar el síndrome metabólico. Los polisacáridos utilizados en la invención se obtienen a partir de fuentes fúngicas según un procedimiento ventajoso, que permite una excelente pureza, una buena reproducibilidad, con una capacidad de producción importante. Los polisacáridos utilizados en la invención están constituidos esencialmente por unidades de D-glucosamina, y/o N-acetil-D-glucosamina y D-glucosa, en particular polímeros de quitina (N-acetil-D-glucosamina) y beta-glucano (D-glucosa). La descripción comprende también todas las modificaciones del polímero o copolímero, por ejemplo mediante injerto de las funciones químicas en el polímero, para mejorar sus propiedades.

[0034] De este modo, la descripción se refiere, según un primer aspecto, a la utilización de, como mínimo, un polisacárido de origen fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, para la fabricación de una composición administrada por vía oral.

[0035] La descripción también se refiere a la utilización de, como mínimo, un polisacárido de origen fúngico insoluble en medio acuoso y orgánico, comprendiendo mayoritariamente dicho polisacárido un copolímero de quitina-glucano, para la fabricación de una composición administrada por vía oral.

[0036] La descripción también se refiere a la utilización de, como mínimo, un polisacárido de origen fúngico que comprende un polímero que comprende enlaces de beta-glucanos, consistiendo dichos enlaces de beta-glucanos esencialmente en enlaces de beta-glucanos en posición 1,3, para la fabricación de una composición administrada por vía oral.

[0037] La descripción también se refiere a la utilización de, como mínimo, un extracto de origen fúngico que contiene esencialmente un polisacárido tal como se ha definido anteriormente, para la fabricación de una composición administrada por vía oral. Ventajosamente el polisacárido comprende más del 70 % de polisacáridos de quitina-glucano en masa con respecto a la masa total del extracto de origen fúngico, preferentemente superior al 85 %.

[0038] El extracto fúngico puede obtenerse a partir de pared celular de micelios fúngicos de diferentes grupos, que incluyen Zigomicetes, Basidiomicetes, Ascomicetes (de los que forma parte *Aspergillus niger*) y Deuteromicetes y/o una mezcla de estos. Dicha fuente de hongos debe seleccionarse de manera que permita la extracción de un polisacárido tal como se ha definido anteriormente y se define a continuación. Existen fuentes de hongos que comprenden glucanos, pero estas unidades son solubles en agua concretamente, o no comprenden o comprenden pocas cadenas de estructura de quitina, y no permiten, por lo tanto, obtener el polisacárido de la presente invención. La fuente fúngica puede ser tanto natural como genéticamente modificada (OGM).

45

[0039] La descripción abarca el conjunto de los hongos que permiten obtener el polímero de quitina-glucano definido en la presente solicitud.

[0040] Ventajosamente, se utiliza un hidrolizado del polisacárido definido anteriormente.

50

[0041] Ventajosamente, el hidrolizado de quitina-glucano tiene una relación entre la quitina y los beta-glucanos comprendida entre 60:40 y 15:85 (m/m).

[0042] Ventajosamente, como mínimo un 85 % de la parte de quitina del copolímero de quitina-glucano son unidades de N-acetil-D-glucosaminas, y como máximo un 15 % de esta parte son unidades de D-glucosaminas.

[0043] De este modo, la invención permite suministrar una composición administrada por vía oral a un ser humano o un animal, preferentemente un mamífero, para obtener un efecto seleccionado entre el grupo que consiste en un efecto antioxidante, hipocolesterolemiantes, hipolipidemiante, hipoglucémico, concretamente en el caso de

diabetes, de saciedad, de mejora del tránsito alimentario, y un efecto de prevención y/o de tratamiento, y/o de lucha contra una patología seleccionada entre el grupo que consiste en la dislipidemia, la aterosclerosis, la obesidad, una enfermedad cardiovascular, el síndrome metabólico, la diabetes y la hiperuricemia. La descripción también se refiere a una composición farmacéutica o de suplemento alimenticio que comprende, como principio activo, como mínimo un polisacárido o un extracto de origen fúngico, tal como se ha definido anteriormente.

[0044] La descripción también se refiere a un método de tratamiento, de prevención o de lucha contra una patología, concretamente la mencionada anteriormente, que comprende la administración por vía oral de una cantidad eficaz a un sujeto que lo necesite de una composición que comprende, como mínimo, un polisacárido tal como se define en la descripción anteriormente y a continuación.

[0045] La presente invención también se refiere a un método para disminuir el peso o prevenir o luchar contra el aumento de peso de un ser humano o un animal, y preferentemente un mamífero. Este método se refiere a un cuidado estético.

[0046] La presente invención también se refiere a un método para favorecer el tránsito alimentario.

[0047] De este modo, la presente invención se refiere a la utilización de un producto de la presente invención para la fabricación de una composición que se utilizará concretamente en uno de los métodos descritos anteriormente o para ejercer uno de los efectos descritos anteriormente y a continuación.

[0048] El experto en la materia determina fácilmente mediante los métodos convencionales las cantidades eficaces de los productos de la invención a utilizar. Se utiliza ventajosamente una cantidad eficaz comprendida entre el 0,001 y el 100 % en peso de productos según la presente invención con respecto al peso total de la composición a administrar. Si los productos se administran en forma de cápsulas, gránulos o comprimidos, pueden utilizarse puros o a cualquier otra concentración, acompañados por otros componentes activos o por excipientes. Si se incorporan en alimentos, la concentración de producto es inferior al 15 %, y preferentemente inferior al 10 %.

[0049] Los productos utilizados en la invención se formulan generalmente en forma de gránulos, de comprimidos, de cápsulas, o también incorporados a alimentos o a bebidas.

[0050] En las figuras:

La figura 1 representa las condiciones de registro del espectro de resonancia magnética nuclear del carbono 13 (13C-RMN) en fase sólida de quitina-glucano F1 y quitina-glucano hidrolizado F4.

La figura 2 representa el espectro de 13C-RMN de quitina-glucano F1 (lote 28).

La figura 3 representa el espectro de 13C-RMN de quitina-glucano hidrolizado F4 (lote 2).

[0051] Los ejemplos forman parte integrante de la presente invención y cualquier característica que parezca nueva con respecto a un estado de la técnica anterior cualquiera a partir de la descripción tomada en su conjunto, incluyendo los ejemplos, forma parte integrante de la invención en su función y en su generalidad.

[0052] De este modo, cada ejemplo tiene un alcance general.

[0053] Por otro lado, en los ejemplos, todos los porcentajes vienen dados en peso, a no ser que se indique lo contrario, y la temperatura se expresa en grados Celsius a no ser que se indique lo contrario, y la presión es la presión atmosférica, a no ser que se indique lo contrario.

Ejemplos

[0054] El procedimiento de obtención de los copolímeros de quitina-glucano obtenidos a continuación se describe en las solicitudes de patente WO 03/068824 y FR 05.07066.

EJEMPLO 1- Ejemplos de copolímeros de quitina-glucano extraídos y purificados del micelio de *Aspergillus niger* (extracto F1)

[0055] Para preparar el copolímero de quitina-glucano F1, una masa de 50 kg (peso seco) de micelio de *Aspergillus niger* húmedo se suspende en una solución de ácido clorhídrico a una concentración del 1 %, a continuación se filtra. La materia sólida se suspende a continuación en una solución de hidróxido de sodio al 0,25 %, a continuación se filtra.

a continuación se filtra. La materia sólida se lava 4 veces con agua, a continuación se seca. A continuación se suspende en etanol, y a continuación se filtra y se seca. Se obtienen aproximadamente 20 kg de quitina-glucano (F1).

5 **[0056]** Las características moleculares y la composición de seis lotes de quitina-glucano F1 se dan en la tabla 1.

[0057] La relación másica de quitina/glucano se calcula a partir del espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) del carbono 13 en fase sólida registrado en las condiciones indicadas en la figura 1 según el método descrito brevemente a continuación. El espectro del compuesto de quitina-glucano F1 (lote 28) se presenta en la figura 2. La proporción de beta-glucano se determina a partir del área de las cuatro bandas de resonancia siguientes: 104 ppm (carbono 1 de la quitina y del beta-glucano), 23 ppm (carbono CH₃ de la quitina), 55 ppm (carbono 2 de la quitina) y 61 ppm (carbono 6 de la quitina y del beta-glucano), tomando como referencia la quitina pura. Por ejemplo, se puede efectuar el cálculo según la fórmula 1, en la que I es el área de las señales de los carbonos, y en la que []_{CG} indica el valor de la relación para la quitina-glucano analizada y []_C para la quitina de referencia. C1 es el carbono 1 de la quitina y del beta-glucano y C2 es el carbono 2 de la quitina.

$$\text{Glucano (\% molar)} = \frac{\left[\frac{I'(C1)}{I'(C2)} \right]_{CG} - \left[\frac{I'(C1)}{I'(C2)} \right]_C}{\left[\frac{I'(C1)}{I'(C2)} \right]_{CG}} \times 100 \quad (1)$$

20 **[0058]** La relación másica quitina/glucano de los seis lotes de quitina-glucano es de media de 39:61 ± 2 (m/m).

[0059] La proporción de unidades D-glucosamina (NGlc), expresada en % molar de la parte de quitina, puede estimarse a partir del espectro de RMN, como fue descrito por Heux y col. (Heux L, Brugnerotto J, Desbrières J, Versali MF & Rinaudo M. (2000) Solid state NMR for determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. Biomacromolecules 1: 746). La proporción de unidades de D-glucosamina es determinada por valoración potenciométrica con hidróxido de sodio, en suspensión en un exceso de ácido clorhídrico.

[0060] La calidad microbiológica de la quitina-glucano y los resultados de búsqueda de agentes patógenos se dan en la tabla 2.

Tabla 1- Características moleculares y composición de diferentes lotes del copolímero de quitina-glucano (F1)

Lote	Relación quitina-glucano (m/m)	NGlc (valoración) % molar	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Metales pesados (ppm)
F1 lote 26	36:64 ± 5*	0	0,4	4,63	0	< LQ**
F1 lote 27	42:58 ± 7	0	1,3	3,54	0	< LQ
F1 lote 28	39:61 ± 7	0	1,5	2,51	2,09	< LQ
F1 lote 29	40:60 ± 6	0	1,7	3,05	0,06	< LQ
F1 lote 30	37:63 ± 1	0	1,9	1,54	1,24	8,7
F1 lote 31	40:60 ± 4	0	2,5	4,26	1,27	< LQ

*desviación típica en el resultado de 4 cálculos de relación quitina-glucano; **LQ: 5 límite de sensibilidad del método de análisis mediante "Ion Coupled Plasma" (5,3 ppm)

Tabla 2- Calidad microbiológica de quitina-glucano F1 (lote 26)

	Número de gérmenes/g
Gérmenes totales aerobios mesófilos	20 ufc/g
esporas aerobias	< 10 ufc/g
Levaduras y mohos	20 ufc/g
Agentes patógenos	
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 10 ufc/g
<i>Escherichia coli</i>	< 10 ufc/g
<i>Staphylococcus coagulase+</i>	< 10 ufc/g
<i>Pseudomonas spp</i>	10 ufc/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia

[0061] Se comprende, de este modo, a partir de las tablas anteriores que el copolímero según la presente invención tiene un grado de pureza elevado.

5 **EJEMPLO 2-** Ejemplos de hidrolizados del copolímero de quitina-glucano (F4)

[0062] En este ejemplo, los hidrolizados de quitina-glucano F4 se obtienen por hidrólisis básica del copolímero de quitina-glucano F1 a 100 °C o por encima, durante, como mínimo, 2 horas, en una solución de hidróxido de sodio de concentración superior al 30 %. La materia se lava con agua varias veces, se suspende en etanol, y a continuación se filtra y se seca. Se obtienen aproximadamente 5 kg de hidrolizado a partir de 20 kg de quitina-glucano F1.

[0063] Las características moleculares y la composición de varios lotes de hidrolizados de quitina-glucano F4 se dan en la tabla 3. La relación quitina/glucano se calcula a partir del espectro de resonancia magnética nuclear del carbono 13 en fase sólida. La relación es variable según el método de hidrólisis empleado. Las condiciones de análisis son idénticas a las utilizadas para F1.

Tabla 3- Características moleculares y composición (cenizas, proteínas) de diferentes lotes de hidrolizados de quitina-glucano (F4)

	Relación quitina-glucano	NGlc (valoración)	Cenizas	Proteínas
	(m/m)	% molar	%	%
F4 lote 1	26:74 ± 3	0,2	ND	0,1
F4 lote 2	25:75 ± 2	0	1,2	8,9
F4 lote 3	61:39 ± 3	0	5,3	3,9

*desviación típica en el resultado de 4 cálculos de relación quitina-glucano

20

[0064] El copolímero según la presente invención tiene un grado de pureza muy elevado.

EJEMPLO 3- Demostración del efecto anti-ateroesclerosis, antioxidante, hipocolesterolemiante, hipolipidemiante, después de la administración oral de quitina-glucano hidrolizado

25

[0065] El modelo animal utilizado es el hámster a régimen aterógeno. Los hámsteres son alimentados con una dieta enriquecida en colesterol, y deficiente en antioxidantes (vitamina C, vitamina E y selenio), lo que conlleva una dislipidemia y lesiones arteriales similares a las lesiones que se encuentran a nivel de las placas de ateroma en el ser humano (Nistor A, Bulla A, Filip DA & Radu A (1987) The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 68: 159). El hámster representa un modelo animal de aterosclerosis particularmente interesante debido a su metabolismo lipídico, su fácil manipulación y el poco tiempo necesario para la inducción de las lesiones (de 8 a 12 semanas). Se ha seleccionado para estudiar los efectos de un hidrolizado de quitina-glucano ya que responde bien a las intervenciones que pretenden disminuir el colesterol y el ateroma (Kowala, MC, Nunnari, JJ, Durham, SK & Nicolosi, RJ (1991) Doxazosin and cholestyramine similarly decrease fatty streak formation in the aortic arch of hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis* 91:3549).

35

[0066] En este ejemplo, dos compuestos cuyas características se resumen en la tabla 4 se administraron en la dieta diaria de los hámsteres:

- 40
- 42,85 mg/kg/día de quitina-glucano hidrolizado F4 (es decir 3 g/día para un hombre de 70 kg)
 - 42,85 mg/kg/día de quitosana de origen fúngico F7 (es decir 3 g/día para un hombre de 70 kg)

[0067] El grupo de control recibe agua mediante alimentación forzada diaria para obtener las mismas condiciones experimentales que los otros grupos y evitar eventuales diferencias debidas al estrés de la alimentación forzada.

- 5 **[0068]** Desde su recepción, 28 hámsteres dorados sirios de aproximadamente 80 gramos, se colocan en jaulas de plástico, divididas en tres lotes de ocho animales en una habitación a 23 °C, con una higrometría del 70 % y con un fotoperiodo de 12 horas (12N/12D). El consumo de alimento y sus pesos se miden todos los días. Los grupos reciben el régimen cuya composición se detalla en la tabla 5.

10

Tabla 4- Características de los compuestos F4 y F7

	F4 Quitina-glucano hidrolizado	F7 Quitosana
Masa molecular	N/A	10000
Quitina (% del copolímero de quitina-glucano)	25	NA
Beta-glucano (% del copolímero de quitina-glucano)	75	2
Glucosamina (% molar de la parte de quitina)	0	90
Cenizas (%)	1,2	1,3
Proteínas (%)	8,9	<1

Tabla 5 - Composición del régimen de los hámsteres

Ingredientes	(g/kg)
Caseína	200
DL-metionina	3
Almidón de trigo	393
Sacarosa	154
Celulosa	50
Aceite de maíz	25
Aceite de colza	25
Mezcla mineral ¹	35
Mezcla vitamínica ²	10
Grasa de cerdo	150
Colesterol	5

¹La mezcla mineral contiene (mg/kg de régimen): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄.7H₂O, 200; elementos traza, 400 (MnSO₄.H₂O, 98; CuSO₄. 5H₂O, 20; ZnSO₄.7H₂O, 80; CoSO₄.7H₂O, 0,16; KI, 0,32; almidón, csp. 40 g (por kg de régimen). Esta mezcla está desprovista de Na₂SeO₃

²Mezcla vitamínica que contiene (mg/kg de régimen): retinol, 12; colecalciferol, 0,125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido patoténico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0,1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzoico, 100; biotina, 0, 6; almidón, csp 20 g (por kg de régimen). Esta mezcla está desprovista de alfa-tocoferol y de ácido ascórbico.

- 15 **[0069]** **Extracción de tejidos.** Después de un periodo experimental de 12 semanas, los hámsteres se colocan 16 horas en ayuno y a continuación se anestesian por vía intraperitoneal.

[0070] **Extracción de plasmas.** En primer lugar se extrae la sangre por punción intracardiaca y a continuación se centrifuga a 3500xg durante 10 minutos. El plasma se recupera, se divide en partes alícuotas y a continuación se conserva a -80 °C. En estos plasmas se determinarán seguidamente el colesterol total, la tasa de colesterol asociada al HDL, la tasa de colesterol asociada al LDL, los triglicéridos, el ácido úrico y la urea.

25 **[0071]** **Extracción de órganos.** Se extrae el hígado después de la perfusión con una solución de tampón fosfato salino (1 mM, pH 7,2) que contiene cloruro de calcio 1 mM y el 0,27 % de glucosa. Esto tiene el objetivo de eliminar la sangre residual que podría conllevar una actividad SOD y GSHPx. Esto a continuación se seca, se pesa y a continuación se conserva a -80 °C. La actividad de la glutatión peroxidasa y de la superóxido dismutasa se determinarán en este órgano.

[0072] A continuación se extrae la aorta después de la fijación del aparato vascular con un tampón cacodilato

de sodio 0,1 M, pH 7,4, que contiene cloruro de calcio 2,5 mM, un 2,5 % de paraformaldehído y un 1,5 % de glutaraldehído. El arco aórtico se extrae a continuación bajo una lupa binocular, se abre longitudinalmente, se fija sobre un trozo de corcho y a continuación se sumerge en la solución de fijación y se almacena a 4 °C. Las lesiones ateromatosas provocadas por el régimen podrán observarse después de la tinción de los lípidos de la pared aórtica.

5

Procesamiento estadístico de los resultados

[0073] Los valores que se presentarán en la parte siguiente corresponden a la media \pm SEM (error estándar de la media) obtenidos en grupos de 8 animales. La significación entre las medias se estableció mediante un análisis con una variable ANOVA utilizando un test de Fischer con ayuda del software StatView 4.5 (ABACCUS Concept, Inc). Cuando a los valores se les asigna una letra idéntica en superíndice, esto significa que estos valores no son significativamente diferentes para $P < 0,05$.

Resultados

15

a- Determinación de la superficie lipídica.

[0074] La superficie de los depósitos lipídicos se determina con ayuda de un microscopio óptico provisto de un aparato fotográfico, después de la tinción histológica según el método descrito por Nunnari y col. (Nunnari JJ, Zand T, Joris I & Majno G. (1989) Quantification of oil Red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. Exp. Mol. Pathol. 51:1).

Tabla 6- Porcentaje de superficie aórtica recubierta de depósitos lipídicos aórticos

	Control	F4	F7
Porcentaje de depósitos lipídicos	14,79 \pm 4,08 ^a	0,35 \pm 0,20 ^b	0,57 \pm 0,37 ^b

25 [0075] Se constata que el producto según la presente invención es más eficaz que la quitosana.

b- Cuantificaciones plasmáticas

[0076] Se efectúan varias cuantificaciones en los plasmas:

30

- Perfil biológico (colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL, ácido úrico, urea)
- Cuantificación de la capacidad antioxidante (TAS)

[0077] **Determinación del colesterol plasmático total.** El análisis se realizó con el kit No. 1489232 Roche/Hitachi, Roche Diagnostics. La cuantificación se basa en la técnica descrita por Allain y col. (Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W & Fu PC. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol, Clin. Chem. 20:470).

40 [0078] **Determinación de los triglicéridos plasmáticos.** El análisis se realizó con el kit No. 1488872 Roche/Hitachi, Roche Diagnostics, según el método desarrollado por Wahlefeld & Bergmeyer (Wahlefeld AW & Bergmeyer HU (1974) en: Methods of enzymatic analysis Second Edition, New York Academic Press p. 1831).

45 [0079] **Determinación de los HDL plasmáticos.** El análisis se realizó con el kit No. 1930672 Roche/Hitachi, Roche Diagnostics. La separación de los HDL se realiza según la técnica descrita por Marz y Gross (Marz W & Gross W. (1986) Evaluation of a phosphotungstic acid/MgCl₂ precipitation and quantitative lipoprotein electrophoresis assay. Clin. Chim. Acta. 158:33).

[0080] **Determinación de los LDL plasmáticos.** El contenido plasmático de LDL-colesterol se calcula mediante diferencia entre el contenido de colesterol total y el contenido de HDL-colesterol.

50

Tabla 7- Perfil de los parámetros bioquímicos

	Control	F4	F7
Colesterol total (g/l)	3,10 \pm 0,30 ^a	2,53 \pm 0,21 ^b	2,37 \pm 0,03 ^b
Triglicéridos (g/l)	1,96 \pm 0,55 ^a	1,04 \pm 0,27 ^{bd}	0,60 \pm 0,21 ^{bc}
HDL (g/l)	0,57 \pm 0,16 ^a	2,01 \pm 0,11 ^{bd}	1,84 \pm 0,09 ^{bc}
LDL (g/l)	2,13 \pm 0,2 ^a	0,24 \pm 0,05 ^b	0,26 \pm 0,09 ^b

[0081] Se constata que los productos de la presente invención tienen un efecto equivalente a la quitosana.

[0082] Determinación de la urea. El análisis se realizó con el kit No. 1489364 Roche/Hitachi, Roche Diagnostics. Esta cuantificación de la urea se basa en un método UV cinético descrito por Talke y Schubert (Talke H & Schubert GE. (1965) Enzymatische Harnstoffbestimmung im blut und serum im optischen test nach Warburg. Klin. Wochenschr. 43:174).

[0083] Determinación del ácido úrico. El análisis se realizó con el kit COBAS INTEGRA 400/700/800 Uric Acid ver.2 (UA2) Roche/Hitachi, Roche Diagnostics. Se trata de un test colorimétrico enzimático según el método modificado de Town y col. (Town MH y col. (1985) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23:591).

Tabla 8- Actividades enzimáticas del plasma

	Control	F4	F7
Ácido úrico (µmol/l)	255,00 ± 37,85 ^a	100,75 ± 62,02 ^{bd}	82,25 ± 21,70 ^{bc}
Urea (mmol/l)	14,87 ± 5,58 ^a	4,00 ± 0,37 ^b	5,25 ± 0,25 ^b

15 **[0084]** Se constata que la actividad enzimática del plasma de los productos de la presente invención es mejor o equivalente a la de la quitosana.

[0085] Cuantificación de la capacidad antioxidante del plasma (TAS). Este parámetro se determina utilizando el Kit Randox No.NX2332 (Laboratorio Randox), cuyo método se basa en la técnica de Miller y col. (Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V & Milner A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, Clinical Science. 84:407).

Tabla 9- Actividad antioxidante del plasma

	Control	F4	F7
Capacidad antioxidante (mmol/l)	1,03 ± 0,08 ^{abd}	1,37 ± 0,07 ^{bce}	0,89 ± 0,04 ^{de}

25 **[0086]** Se constata que los productos de la presente invención tienen una actividad antioxidante del plasma completamente sorprendente y no comparable a la de la quitosana que inhibe la actividad antioxidante del plasma.

c- Cuantificación de las actividades enzimáticas hepáticas

30 **[0087] Preparación de las fracciones citosólicas de hígado.** La actividad enzimática hepática se mide en fracciones citosólicas; en efecto, al situarse las enzimas en el citosol, es necesario proceder a una ultracentrifugación en dos etapas: una primera centrifugación de los homogeneizados de hígado al 5 % en NaCl 0,15 M, a 8000 x g durante 20 minutos a 4 °C, lo que permite recuperar un sobrenadante. Este último se somete a continuación a una ultracentrifugación a 105.000 x g durante una hora a 4 °C. El citosol se conserva a -80 °C en vista de las cuantificaciones. La cuantificación de las proteínas se efectúa mediante el método con ácido bincinónico, según Smith y col. (Smith PK y col. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150:76).

40 **[0088] Actividad de la glutatión peroxidasa (Se-GSHPx).** La medición de actividad de esta enzima se basa en la capacidad de la muestra para catalizar la oxidación del glutatión con agua oxigenada, según el método de Wendel (Wendel A. (1981) Glutathione peroxidase. Methods in enzymology, 77:327)

Tabla 10- Actividad específica de la Se-GSHPx hepática

	Control	F4	F7
Se-GSHPx (U/mg proteínas)	109,12 ± 88,94 ^a	134,04 ± 1,49 ^a	142,85 ± 54,60 ^a

45 **[0089]** Se constata que los productos de la presente invención tienen una actividad enzimática hepática equivalente a la de la quitosana.

[0090] Actividad de la superóxido dismutasa (SOD). La actividad de la SOD se determina con el kit SOD 525 (Tebu-Bio) según el método de Paoletti y Mocali (Paoletti F & Mocali A. (1990) Determination of superoxydo dismutase activity by purely chemical system based on NADCPJH oxidation, Methods Enzymology. 186:209).

Tabla 11: Actividad específica de la SOD hepática

	Control	F4	F7
SOD (U/mg proteínas)	0,58 ± 0,56 ^a	0,03 ± 0,02 ^{bd}	0,04 ± 0,01 ^{cd}

[0091] Se constata que los productos de la invención tienen una actividad sobre la superóxido dismutasa comparable a la de la quitosana.

5

[0092] Para resumir los resultados, las tablas 12 y 13 reúnen las variaciones de los diferentes parámetros expresados en % con respecto al grupo de control

Tabla 12- Variaciones de la superficie de los depósitos lipídicos aórticos y de las actividades enzimáticas hepáticas expresadas en % con respecto al grupo de control.

10

	Se-GSHPx (U/mg proteínas)	SOD (U/mg proteínas)	Porcentaje depósitos lipídicos
F4	+22,8 %	-94,8 %	-97,6 %
F7	+30,9 %	-93,1 %	-96,1 %

Tabla 13- Variaciones de los diferentes parámetros bioquímicos expresados en %, con respecto al grupo de control.

	Colesterol total (g/l)	Triglicéridos (g/l)	HDL (g/l)	LDL (g/l)	Capacidad antioxidante (mmol/l)	Ácido úrico (μmol/l)	Urea (mmol/l)
F4	-18,4 %	-46,9 %	+252,6 %	-88,7 %	+33,1 %	-60,5 %	-73,1 %
F7	-23,5 %	-69,4 %	+222,8 %	-87,8 %	-13,6 %	-67,7 %	-64,7 %

[0093] El colesterol total, los triglicéridos, el HDL-colesterol y el LDL-colesterol son parámetros bioquímicos que permiten constatar los efectos anti-colesterolemiantes del quitina-glucano hidrolizado y de la quitosana. En efecto, la disminución del colesterol total y del LDL-colesterol (disminución significativa de un factor 10) con respecto al grupo de control permiten confirmar la eficacia del quitina-glucano hidrolizado y de la quitosana en la prevención del desarrollo de la placa de ateroma y, como consecuencia, de las enfermedades cardiovasculares.

[0094] El aumento del HDL-colesterol es espectacular. Se traduce en un favorecimiento del flujo de salida del colesterol de los órganos periféricos hacia el hígado, disminuyendo de este modo el riesgo de depósitos y de oxidación de las partículas ricas en colesterol en los órganos y las arterias. Los tratamientos a base de F4 y F7 permiten invertir los niveles de HDL/LDL con respecto al control.

[0095] El porcentaje de la superficie del arco aórtico recubierto por los depósitos lipídicos y las células espumosas es un indicador directo del desarrollo de las lesiones ateromatosas. Con respecto a los controles, los dos tipos de tratamiento reducen de forma muy significativa este porcentaje, con un nivel de eficacia casi similar alrededor del 97 %. Ahora bien, compuestos reputados muy eficaces para la reducción de los depósitos lipídicos como los polifenoles del vino presentan una reducción de la superficie del arco aórtico por los depósitos lipídicos del 70 al 90 % según las moléculas estudiadas con el mismo modelo de hámster en régimen aterógeno (Auger R y col. J. Agric. Food Chem. (2005) 53: 9823; Auger R y col. (2005) J. Agric. Food Chem. 53: 2015; Auger R y col. (2004) J. Agric. Food Chem. 52:5297).

[0096] Solamente F4 aumenta la capacidad antioxidante del plasma, un 33,1 % con respecto al grupo de control. En lo que respecta a las actividades de las enzimas hepáticas implicadas en el sistema antioxidante, se observa que la actividad de la glutatión peroxidasa selenio-dependiente ha aumentado, y que la actividad SOD es disminuida fuertemente por los tratamientos con F4 y F7 con respecto al grupo de control.

[0097] De este modo, se puede constatar una disminución muy importante (60 al 70 %) del ácido úrico así como de la urea en el plasma para dos grupos tratados con F4 y F7. Las reducciones observadas expresan una eliminación más importante del ácido úrico y de la urea por el riñón, lo que disminuye el riesgo de hiperuricemia, parámetro que es conocido que favorece el desarrollo de la placa de ateroma.

[0098] La importante mejora del perfil lipídico y de los parámetros asociados para el modelo animal utilizado permite concluir que el consumo regular de quitina-glucano hidrolizado es beneficioso para la prevención de la aterosclerosis y por extensión en la obesidad, con efectos comparables, incluso mejores que los inducidos por el consumo de quitosana.

EJEMPLO 4- Efecto de la administración oral de quitina-glucano sobre el tracto gastrointestinal, el perfil glucídico y el perfil lipídico en rata**Protocolo**

5 **[0099]** El modelo utilizado es la rata sana con alimentación estándar y bebida enriquecida en fructosa (21 %), que favorece una esteatosis hepática, mediante una metabolización rápida de la fructosa por el hígado que da como resultado una hipertrigliceridemia, una hiperinsulinemia y una disminución de la acción de la insulina a nivel del músculo esquelético y del hígado.

10 **[0100]** El quitina-glucano (tabla 14) se administra en la dieta diaria de las ratas a razón del 10 %, dosis capaz de generar un efecto agudo en el animal. Se estudian los efectos a corto plazo y a largo plazo. El grupo de control recibe una alimentación estándar enriquecida en fructosa (tabla 15). 10 ratas Wistar macho de aproximadamente 100-125 g, se distribuyen en jaulas en dos grupos (control/tratado) en una habitación a 23 °C, con una higrimetría del 70 % y con un fotoperiodo de 12 horas (12N/12D).

[0101] El consumo de alimento y la evolución del peso se miden una vez por semana. La producción de heces en 24 h así como el contenido de agua de estas se estiman después de 2 semanas de tratamiento. Después del periodo de aclimatación (1 semana) en el que los animales reciben una alimentación estándar no enriquecida en fructosa, se efectúa una evaluación del vaciado gástrico y de la respuesta glucémica en presencia de quitina-glucano. Las ratas se someten a ayuno durante 18 horas. El grupo tratado recibe una solución de glucosa-paracetamol-quitina-glucano (10 %) mediante alimentación forzada mientras que el grupo de control recibe una solución de glucosa-paracetamol. Se efectúan extracciones de sangre durante 2 horas (glucemia, insulinemia, paracetamol). Del mismo modo, se efectúa una evaluación del vaciado gástrico y de la respuesta glucémica en ausencia de quitina-glucano después de 3 semanas de tratamiento. En este caso, las ratas se someten a ayuno durante 18 h y se administra una solución de glucosa-paracetamol mediante alimentación forzada durante 2 días. Se efectúan extracciones de sangre durante 2 horas (glucemia, insulinemia, paracetamol). En el transcurso de la tercera semana de tratamiento, las ratas se someten a ayuno durante 18 horas. A continuación, se efectúa una evaluación del tiempo de tránsito oro-fecal. Las dietas teñidas con una solución de rojo Carmín se ofrecen a las ratas. Se determina el tiempo de aparición de las primeras heces teñidas.

[0102] Después de 4 semanas de tratamiento, las ratas son anestesiadas y se efectúa una laparatomía. La sangre de las venas porta y cava se centrifuga para recuperar el suero y/o el plasma. Los perfiles lipídico (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol) y glucídico (glucosa, insulina) se analizan a partir de estos últimos. Los diferentes órganos se extraen, se pesan y se conservan para estimar la fermentación cecal (proliferación cecal, pH cecal, contenido de ácidos carboxílicos de cadena corta), el contenido de lípidos del hígado y de las heces y, la masa adiposa (peso de los tejidos adiposos epididimal y visceral).

Resultados

40 **[0103]** Los resultados muestran que un consumo regular de quitina-glucano favorece un tránsito intestinal equilibrado así como un equilibrio de la homeostasis de los perfiles lipídico y glucídico en un modelo de rata. Se ve que el «efecto fibra» tiene un efecto preventivo sobre los parámetros directamente vinculados a las enfermedades metabólicas tales como la hipercolesterolemia, la diabetes o, por extensión, el síndrome metabólico y la obesidad. En efecto, las fibras reducen la densidad calórica del alimento (número de calorías por 100 g), ralentizan significativamente el vaciado gástrico y la digestión de los alimentos, y reducen significativamente la secreción de insulina. La conjunción de estos efectos conduce a una disminución espontánea del consumo calórico y de la sensación de hambre.

50 **[0104]** El quitina-glucano induce una fermentación a nivel cecal. Esta fermentación está acompañada por la producción de ácidos grasos de cadena corta significativamente más elevada en el grupo que recibe quitina-glucano con respecto al grupo de control, influyendo en la homeostasis celular epitelial. Esto contribuye de este modo a reducir los riesgos de atrofia, a estimular la recuperación de un epitelio intestinal dañado, y/o a inhibir la hiperproliferación celular.

55

Tabla 14- Características moleculares y composición del copolímero de quitina-glucano

Relación quitina-glucano	Cenizas	Proteínas	Lípidos	Metales pesados
35/65	2,3	7,71	1,5	< 20

Tabla 15- Composición de la alimentación de las ratas (dieta AO4 estándar, UAR, Francia)

	%
Proteínas	19,3
Glúcidos:	70,4
- Celulosa	5
- Almidón	38
- Sacarosa	3
- Otros no digestibles	8
Lípidos	3
Mezclas minerales/vitaminas	7,3

5 **Tabla 16-** Variación de los parámetros bioquímicos y fisiológicos de los grupos de ratas que han consumido quitina-glucano, con respecto al grupo de control

	Quitina-glucano (CG)
Evolución del peso	∨
Consumo de alimento	∨
Glucemia	≅
Insulinemia	∨
Masa adiposa	∨
Producción de heces en 24 h	∧
Vaciado gástrico	∨
Tránsito oro-fecal	∨
Fermentación cecal	∧
∨: significativamente más bajo que el valor del grupo de control (p<0,05); ∧: significativamente más elevado que el valor del grupo de control (p<0,05); ≅ significativamente inalterado (p<0,05)	

EJEMPLO 5- Capacidad de absorción de agua del quitina-glucano

10 **[0105]** Para imitar el comportamiento del quitina-glucano en el tracto gastrointestinal, el polvo de quitina-glucano se coloca en presencia de agua, de NaCl y de soluciones acuosas a diferentes pH. Después de un tiempo de contacto de 12 horas con agitación, se separa el quitina-glucano por centrifugación, y se determina la masa húmeda.

15 **Tabla 17-** Capacidad de hinchado del quitina-glucano en diferentes medios (g de agua absorbida por 100 g de quitina-glucano seco)

Agua	NaCl 5 %	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
7	7	7	6	7	7

Resultados

20 **[0106]** Se ve, mediante este ejemplo, que el quitina-glucano es capaz de absorber aproximadamente 7 veces su masa en agua o en medio acuoso, lo cual es del mismo orden de magnitud que la tasa de hinchado de las fibras alimentarias insolubles comerciales conocidas, como por ejemplo hemicelulosa y pectina (de 4 a 8 veces su masa en agua).

25 **EJEMPLO 6- Demostración del efecto anti-arterosclerosis, antioxidante, hipocolesterolemante, hipolipidemiante después de la administración oral de quitina-glucano en hámster**

Protocolo

30 **[0107]** El modelo utilizado es el mismo que el presentado en el ejemplo 3. En este ejemplo, dos compuestos cuyas características se resumen en la tabla 6.1., se administraron en la dieta diaria de los hámsteres:

- **Grupo CG2:** 42,85 mg/kg/día de quitina-glucano (es decir 2 g/día para un hombre de 70 kg)

- **Grupo CG1,5:** 21,43 mg/kg/día de quitina-glucano (es decir 1,5 g/día para un hombre de 70 kg)
- **Grupo Cs2:** 28,57 mg/kg/día de quitosana (es decir 2 g/día para un hombre de 70 kg)

[0108] El grupo de control recibe agua mediante alimentación forzada diaria para obtener las mismas 5 condiciones experimentales.

Tabla 18- Características de los compuestos quitina-glucano y quitosana

	Quitina-glucano (CG)	Quitosana (Cs)
Masa molecular	N/A	29.000
Quitina (% del copolímero de quitina-glucano)	35	N/A
Beta-glucano (% molar de la parte de quitina)	65	2,1
Glucosamina (% molar de la parte de quitina)	0	89
Cenizas (%)	2,3	2,66
Proteínas (%)	7,7	0,31

[0109] Desde su recepción, 48 hámsteres dorados sirios de aproximadamente 100 g, se colocan en las 10 mismas condiciones experimentales del ejemplo 3. El consumo de alimento y su peso se miden todos los días. Los grupos reciben la misma alimentación que la presentada en el ejemplo 3 (tabla 5).

Resultados

15 **[0110]** Las extracciones, los análisis estadísticos y los métodos de análisis son los mismos que los presentados en el ejemplo 3. El conjunto de los resultados se presenta en la tabla 19.

Tabla 19- Variación de los parámetros bioquímicos de los grupos de hámsteres que han consumido quitina-glucano y quitosana, con respecto al grupo de control

	Grupo CG2 (2 g/día)	Grupo CG1,5 (1,5 g/día)	Grupo Cs2 (2 g/día)
Colesterol total	↘	↘	↘
Triglicéridos	↘	↘	↘
HDL-Colesterol	↗	↗	↗
LDL-colesterol	↘	↘	↘
Capacidad antioxidante	↗	↗	↘
Ácido úrico	↘	↘	↘
Urea	↘	↘	↘
Se GSHPx	↗	↗	↗
SOD	↘	↘	↘
Porcentaje de depósitos lipídicos	↘	↘	↘

↘: significativamente más bajo que el valor del grupo de control ($p < 0,05$); ↗: significativamente más elevado que el valor del grupo de control ($p < 0,05$)

20 **[0111]** Se ve mediante este ejemplo que la quitina-glucano conlleva las mismas variaciones de los parámetros bioquímicos de las ratas en régimen aterógeno que los productos estudiados en el ejemplo 3. El quitina-glucano mejora de manera importante el perfil lipídico y los parámetros asociados, a las dos dosis estudiadas. El consumo regular de quitina-glucano es, por lo tanto, beneficioso en la prevención de la aterosclerosis y, por 25 extensión, de las patologías asociadas.

REIVINDICACIONES

1. Polisacárido de origen fúngico o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización en la prevención, el tratamiento, o la lucha contra la dislipidemia, la hipercolesterolemia, la aterosclerosis, una patología asociada a la aterosclerosis, la obesidad, una enfermedad cardiovascular, el síndrome metabólico, la diabetes, la hiperglucemia o la hiperuricemia, o para favorecer la saciedad, favorecer el tránsito alimentario o favorecer el equilibrio de la homeostasis lipídica y glucídica, comprendiendo dicha utilización la administración por vía oral de dicho polisacárido de origen fúngico o de dicha composición que lo comprende, a un ser humano o un animal, preferentemente un mamífero.
2. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la relación entre la quitina y los beta-glucanos está comprendida entre 70:30 y 20:80.
3. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** la relación entre la quitina y los beta-glucanos está comprendida entre 50:50 y 10:90.
4. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el polisacárido o extracto fúngico comprende más del 70 % de polisacáridos de quitina-glucano en masa con respecto a la masa total del extracto de origen fúngico o del polisacárido.
5. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el polisacárido o extracto fúngico comprende más del 85 % de polisacáridos de quitina-glucano en masa con respecto a la masa total del extracto de origen fúngico.
6. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** se trata de un polisacárido de origen de *Aspergillus niger* o un extracto de *Aspergillus niger*.
7. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se trata de un hidrolizado del polisacárido.
8. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se trata de un hidrolizado de quitina-glucano que tiene una relación entre la quitina y los beta-glucanos comprendida entre 60:40 y 15:85 (m/m).
9. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización como composición farmacéutica en la prevención, el tratamiento o la lucha contra una dislipidemia y/o una hipercolesterolemia.
10. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización como composición farmacéutica para favorecer la saciedad y/o el tránsito alimentario de un ser humano o animal.
11. Polisacárido de origen fúngico, o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o composición que comprende dicho polisacárido, tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su utilización como composición farmacéutica en la prevención, el tratamiento o la lucha contra una enfermedad cardiovascular.

12. Utilización no terapéutica de una composición como suplemento alimenticio para favorecer la saciedad o el tránsito alimentario de un ser humano o animal, comprendiendo dicha composición, como mínimo, un polisacárido de origen fúngico o, como mínimo, un extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

5

13. Utilización de, como mínimo, un polisacárido de origen fúngico, comprendiendo mayoritariamente dicho polisacárido un copolímero de quitina-glucano, para la fabricación de una composición administrada por vía oral a un ser humano o un animal, preferentemente un mamífero, para la prevención, el tratamiento o la lucha contra una dislipidemia, una hipercolesterolemia, la aterosclerosis, una enfermedad cardiovascular, el síndrome metabólico, la diabetes, una hiperglucemia o la hiperuricemia, o para favorecer la saciedad, favorecer el tránsito alimentario o favorecer el equilibrio de la homeostasis lipídica y glucídica.

10

14. Método de cuidado estético para disminuir, prevenir o luchar contra el aumento de peso de un ser humano o animal, y preferentemente de un mamífero, comprendiendo dicho método la administración por vía oral de un polisacárido de origen fúngico o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano, o de una composición que comprende dicho polisacárido, a un ser humano o un animal, preferentemente un mamífero de un polisacárido de origen fúngico o extracto fúngico que comprende mayoritariamente un copolímero de quitina-glucano.

15

```

Current Data Parameters
NAME          JGgautier
EXPNO         106
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date          20040713
Time          10.15
INSTRUM       spect
PROBHD        BL4   N-F/H 40
PULPROG       cp4c.98
TD            3800
SOLVENT
NS            600
DS            0
SWH           39920.160 Hz
FIDRES        10.505305 Hz
AQ            0.0476450 sec
RG            262144
DW            12.525 use
DE            14.29 use
TE            300.0 K
D1            5.00000000 sec

===== CHANNEL F1 =====
NUC1          13C
P15           2500.00 use
PL1           17.50 dB
SFO1          100.6353010 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2       tppm15
NUC2          1H
P3            3.00 use
P31           5.80 use
PL2           9.00 dB
PL12          7.50 dB
SFO2          400.1720000 MHz
SFO           10.50 dB
SPNAM0        square.64
SPOFF0        0.00 Hz

F2 - Processing parameters
SI            8192
SF            100.6228351 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            40.00 Hz
GB            0
PC            0.50

-1D NMR plot parameters
CX            20.00 cm
F1F           120.000 ppm
F1            12074.74 Hz
F2P           0.000 ppm
F2            0.00 Hz
PPMCM         6.00000 ppm
H2CM          603.73700 Hz/
    
```

FIG.1

LCB 28-4, rot 7kHz, 11:14 AM 9/1/2005

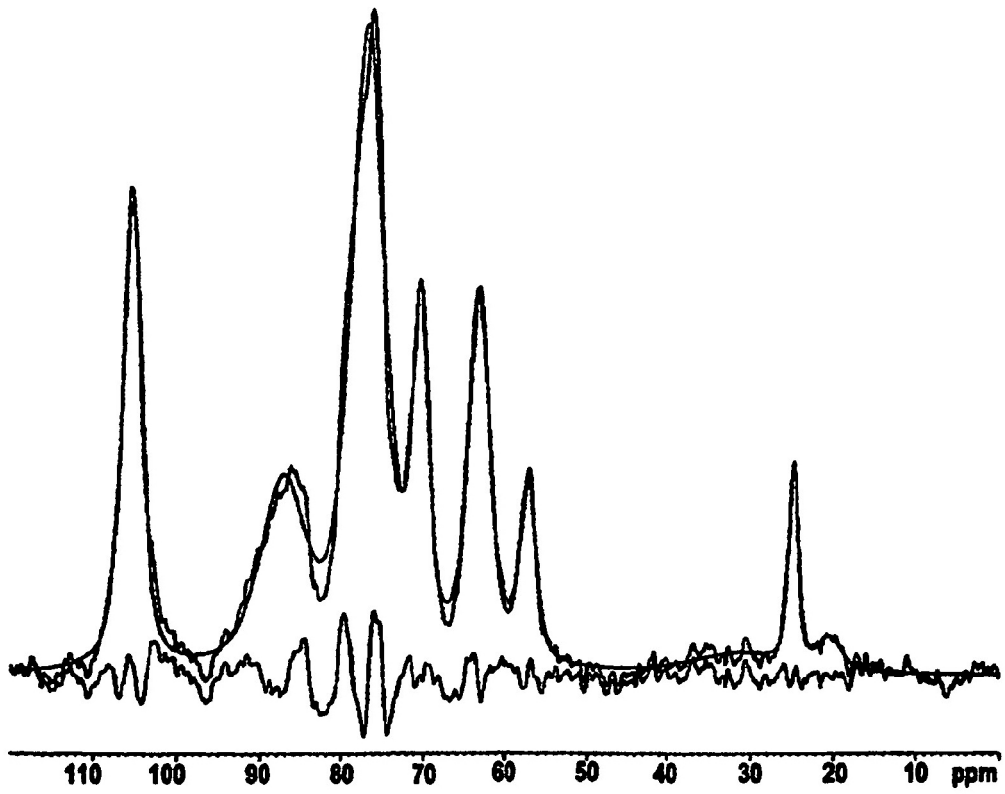


FIG.2

FBI-33, rot 7kHz, 10:32 AM 7/13/2004

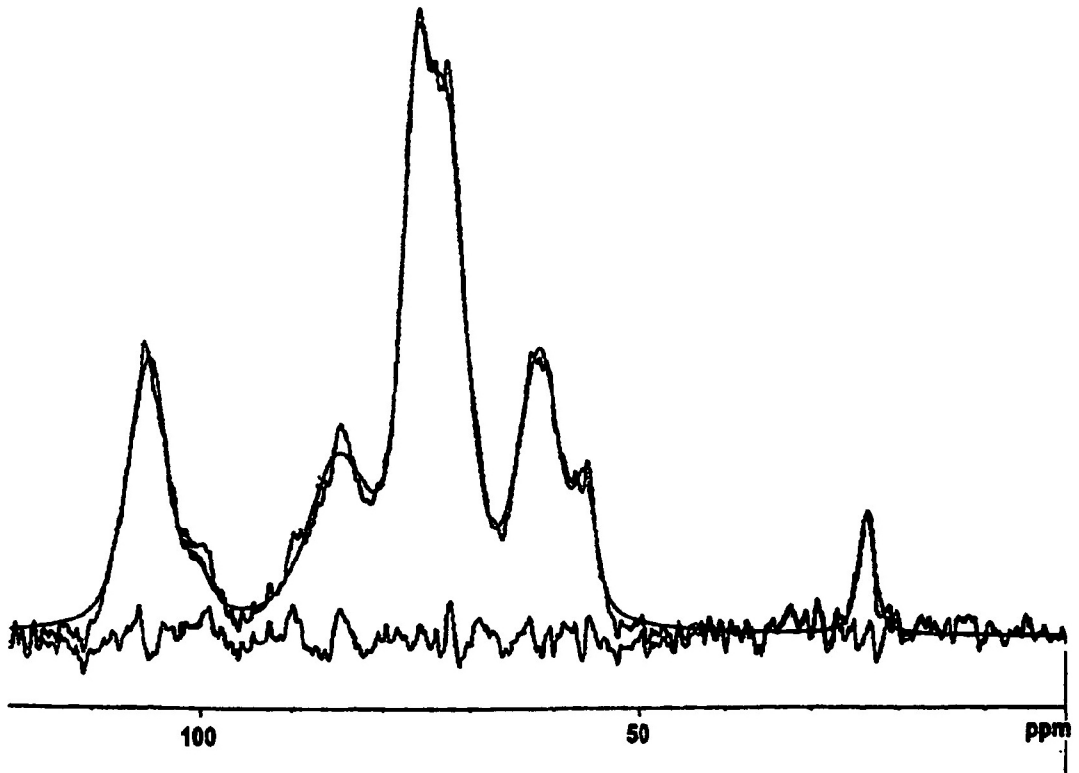


FIG.3