

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 728**

21 Número de solicitud: 201830227

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

08.03.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.09.2019

71 Solicitantes:

BODEGA MATARROMERA, S.L. (50.0%)

Ctra. San Bernardo s/n

47359 Valbuena de Duero (Valladolid) ES y

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

MORO GONZÁLEZ, Luis Carlos;

GUADARRAMA RODRIGUEZ, Alberto;

VENDRELL LAGUNA, Victor David;

SEVILLANO GARCÍA, Maria;

MORENO-ARRIBAS, Mª Victoria;

BARTOLOMÉ SUALDEA, Begoña y

GIL-SÁNCHEZ, Irene

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

54 Título: **Composición para la regulación del metabolismo de la glucosa**

57 Resumen:

Composición para la regulación del metabolismo de la glucosa.

La presente invención se refiere a una composición para regular el metabolismo de glucosa que comprende como ingredientes activos uno o más polifenoles a una concentración de entre 0,5 y 100 mg / g de la composición y fibras dietéticas, donde las fibras dietéticas comprenden uno o más azúcares o derivados de los mismos a una concentración de 50 a 600 mg / g en base a la composición. Los azúcares comprenden especialmente azúcares neutros seleccionados del grupo que comprende celulosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa y cualquier combinación de los mismos. La composición se usa para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con trastornos del metabolismo de la glucosa.

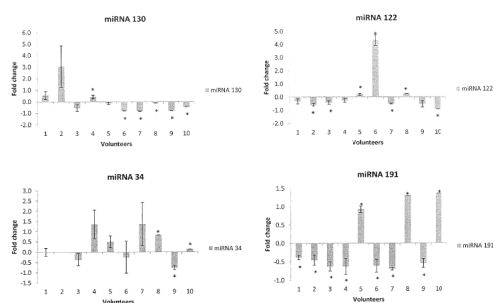


Fig. 1

DESCRIPCIÓN

Composición para la regulación del metabolismo de la glucosa

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención pertenece al sector alimentario y / o farmacéutico, en particular, se refiere a la composición funcional de los ingredientes.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR A LA INVENCION

- 10 Los niveles altos de glucosa en sangre estimulan la secreción de insulina por las células beta pancreáticas. La insulina a su vez estimula la entrada de glucosa en los músculos y las células adiposas, lo que lleva al almacenamiento de glucógeno y triglicéridos y a la síntesis de proteínas. La activación de receptores de insulina en varios tipos de células disminuye los niveles circulantes de glucosa al aumentar la captación y utilización de glucosa, y al reducir la producción de glucosa hepática. Las alteraciones de esta red regulatoria pueden resultar en diabetes y síndromes patológicos asociados que afectan a un porcentaje grande y creciente de la población humana.
- 15 Los pacientes que tienen un trastorno del metabolismo de la glucosa pueden padecer de hiperglucemia, hiperinsulinemia y / o intolerancia a la glucosa. Un ejemplo de un trastorno que con frecuencia se asocia con los niveles aberrantes de glucosa y / o insulina es la resistencia a la insulina, en la que las células hepáticas, grasas y musculares pierden su capacidad de responder a los niveles normales de insulina en la sangre.
- 20 En vista de la prevalencia y severidad de la diabetes y los trastornos metabólicos y no metabólicos asociados, siguen siendo de interés las modalidades de tratamiento que modulan, por ejemplo, los niveles de glucosa y / o insulina y mejoran la respuesta biológica a los niveles fluctuantes de glucosa en un paciente. También es importante reducir el riesgo de tales enfermedades y trastornos, especialmente la diabetes tipo 2.
- 25 Los polifenoles son compuestos químicos o sustancias que se encuentran en una gran cantidad de alimentos derivados de plantas. El término abarca una amplia variedad de moléculas con una estructura común, caracterizada por tener varios grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. Sin embargo, los polifenoles también incluyen moléculas con un anillo de fenol, como en el caso de los ácidos fenólicos o los alcoholes fenólicos.
- 30 Clasificación de polifenoles

Los polifenoles se clasifican en función del número de anillos de fenol que contienen, así como de los elementos estructurales que unen estos anillos. Como tal, los principales grupos de polifenoles son:

5 Flavonoides: los cuales presentan un esqueleto de carbono de difenilpropano y dos anillos de benceno unidos juntos por una cadena lineal de 3 átomos de carbono. Hasta la fecha, se han identificado más de 6.000 flavonoides en las plantas, y la lista continúa creciendo. Los flavonoides se pueden dividir en 6 subclases, en función del estado de oxidación del anillo de pirano central. Los flavonoides se pueden dividir en Flavonoles, Flavonas, Flavanonas, Isoflavonas, Antocianinas y Flavanoles.

10 Flavonoles: que tienen un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, con un grupo hidroxilo en C3.

Son los flavonoides más ubicuos en los alimentos, y la quercetina es la más representativa.

15 Flavonas: Presentan un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, y son los flavonoides menos comunes. Se encuentran en el perejil y en el apio.

Flavanonas: Se caracterizan por tener una cadena saturada de 3 átomos de carbono y un átomo de oxígeno en el carbono 4. Se encuentran solo en altas concentraciones en los cítricos, aunque también están presentes en los tomates y en algunas plantas aromáticas como la menta.

20 Isoflavonas: que son estructuralmente similares a los estrógenos, y en los pies se pueden unir a sus receptores, por lo que también se conocen como fitoestrógenos. La soja y sus derivados son las principales fuentes de isoflavonas.

Antocianinas: que son los pigmentos responsables de la coloración roja, azul y púrpura de frutas, flores y otros tejidos y productos vegetales

25 Flavanoles: que tienen una cadena saturada de 3 carbonos, con un grupo hidroxilo en C3. Existen tanto como monómeros como polímeros, conocidos como catequinas y proantocianidinas, respectivamente.

30 Los principales flavonoides en la fruta son la catequina y la epicatequina, mientras que la galocatequina, la epi-galocatequina y el galato de epigalocatequina se encuentran esencialmente en el té. Las catequinas se encuentran en frutas como los albaricoques y las cerezas y en otros productos como el té, el chocolate y el vino blanco.

Ácidos fenólicos: que se dividen en dos grupos, los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico.

Ácidos hidrobenczoicos: que se encuentran en muy pocas plantas consumidas por humanos, y por lo tanto no se consideran de particular interés para la nutrición. Entre
5 ellos, destacan el ácido gálico o ácido egálico

Ácidos hidroxicinámicos: que están representados principalmente por ácido cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico.

Alcoholes fenólicos: tirosol e hidroxitirosol son los principales tipos. Se encuentran principalmente en el aceite de oliva. El tirosol también se encuentra en el vino, tanto
10 blanco como tinto, y en la cerveza; el hidroxitirosol, por otro lado se encuentra en el vino tinto.

Estilbenos: el principal estilbeno presente en la dieta de los humanos es el resveratrol, aunque la cantidad de estos compuestos ingeridos en la dieta es pequeña. Los estilbenos son producidos por las plantas como respuesta a patógenos o a ciertas condiciones de
15 estrés. Se han detectado en más de 70 especies de plantas, como uvas, bayas y cacahuetes.

Lignanós: los lignanos se producen por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano. La principal fuente de estos compuestos es la semilla de lino.

La fuente principal de polifenoles para alimentos es el orujo de uva (GP). El orujo de uva
20 es un subproducto de la bodega compuesto básicamente por semillas de uva, piel y tallos. Es rico en fibra dietética y polifenoles, incluidas las antocianinas (en tintoGP), flavan-3-oles, flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos (Fontana, Antoniolli y Bottini, 2013), que proporcionan una amplia variedad de posibles actividades biológicas (Yu y Ahmedna, 2013).

25 En los últimos años, ha aumentado el interés en el uso de GP para desarrollar ingredientes funcionales y en otras aplicaciones para la industria alimentaria (Charalampia & Koutelidakis, 2016). Pero la mayoría de la evidencia científica relacionada con los beneficios de GP se deriva de experimentos realizados *in vitro* y en modelos animales, a menudo usando una concentración mucho más alta que la
30 contenida en fluidos biológicos y en la dieta, respectivamente. Además, en algunos casos, se prueban los compuestos GP originales en lugar de sus metabolitos derivados,

que serían los responsables de los efectos beneficiosos *in vivo* (D'Archivio, Filesì, Vari, Scazzocchio, y Masella, 2010).

Se han publicado dos estudios de intervención humana sobre los efectos de la inclusión de GP en la dieta humana. Yubero et al. (2013) evaluaron los efectos de aportar un suplemento con extracto de GP (700 mg / día, 56 días) sobre el riesgo cardiovascular y los indicadores de estrés oxidativo en voluntarios sanos (n = 60). Los resultados de este estudio mostraron que el suplemento con el extracto de GP fue capaz de modular el perfil lipídico, disminuyendo el colesterol total en sangre y los niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) (Yubero et al., 2013). Por su parte, Urquiaga et al. (2015) investigaron el efecto del aporte de un suplemento con una harina de GP (20 g / día, 16 semanas, aproximadamente 10 g de fibra dietética / día) en pacientes masculinos (n = 38) que presentaban al menos un síntoma de síndrome metabólico. Los resultados de este estudio indicaron una mejora significativa en la presión arterial, los niveles de glucosa en ayunas y el daño proteico después del aporte con harina de GP (Urquiaga et al., 2015).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto principal de esta invención es una composición para regular el metabolismo de la glucosa que comprende como ingredientes activos los siguientes componentes:

- a) una o más concentraciones de polifenoles en una concentración de entre 0,5 y 100 mg / g de la composición;
- b) fibras dietéticas, en las que las fibras dietéticas comprenden uno o más azúcares o derivados del mismo a una concentración de 50 a 600 mg / g en base a la composición.

Preferiblemente, el compuesto o compuestos de polifenol comprenden ácido elágico, flavanoles o flavonoles o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente ácido elágico, flavanoles y flavonoles. Preferiblemente, los polifenoles comprenden como flavanoles catequina, epicatequina o proantocianidina o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente catequina, epicatequina y proantocianidina. Preferiblemente la composición comprende como flavonoles, miricetina, quercetina o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente micetrina, quercetina y kaempferol.

Uno o más azúcares o derivados de los mismos son preferiblemente los azúcares medidos por hidrólisis del residuo insoluble en alcohol (RIA) de la composición.

Preferiblemente los azúcares comprenden azúcares neutros y ácidos urónicos. Preferiblemente, los azúcares neutros seleccionados del grupo que comprende celulosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa y cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, los azúcares neutros se seleccionan del grupo que consiste en celulosa,
5 glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa y cualquier combinación de las mismas.

Preferiblemente, la concentración total de fibras dietéticas en la composición es de 50 a 850 mg / g, más preferiblemente de 300 mg / g a 850 mg / g, incluso más preferiblemente de 550 mg / g a 750 mg / g.

Preferiblemente, la concentración total de uno o más polifenoles está entre 10 y 100 mg /
10 g, más preferiblemente entre 20 y 50 mg / g. La concentración total se mide en mg de ácido gálico / g.

Preferiblemente, la concentración total de fibras dietéticas es al menos 3 veces mayor que la concentración de polifenoles, más preferiblemente entre 5 y 30 veces mayor.

Preferiblemente, la concentración de azúcares neutros es de 5 a 20 veces mayor que la
15 concentración de los ácidos urónicos.

En una realización preferida de la invención, la composición comprende la siguiente concentración de polifenoles en peso:

- ácido elágico: entre 0,5 y 10 mg / g de la composición

- flavanoles: entre 0,2 y 20 mg / g de la composición

20 - flavonoles: entre 0,11 y 12 mg / g de la composición.

Preferiblemente, los flavanoles comprendidos por la composición son los siguientes:

• catequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición

• epicatequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición

• proantocianidina: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición.

25 Preferiblemente, los flavonoles comprendidos por la composición son los siguientes:

• miricetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición

• quercetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición

- kaempferol: entre 0,01 y 2 mg / g de la composición.

Preferiblemente, los azúcares comprendidos por las fibras dietéticas son los siguientes:

- azúcares neutros: entre 150 y 550 mg / g de la composición
- Ácidos urónicos: entre 1 y 100 mg / g de la composición

- 5 - Lignina Klason: entre 1 y 200 mg / g de la composición.

Preferiblemente, los azúcares neutros comprendidos por la composición son los siguientes:

- celulosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- glucosa: entre 150 y 400 mg / g de la composición
- 10 • xilosa: entre 0,1 y 5 mg / g de la composición
- galactosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- arabinosa: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición
- manosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición

- 15 En una realización preferida de la invención, la composición comprende la siguiente concentración de polifenoles en peso:

- ácido elágico: entre 0,5 y 10 mg / g de la composición
- flavanoles: entre 0,2 y 20 mg / g de la composición
- flavonoles: entre 0,11 y 12 mg / g de la composición,

y en donde, los flavanoles comprendidos por la composición son los siguientes:

- 20 • catequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- epicatequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
 - proantocianidina: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición,

y en donde, los flavonoles comprendidos por la composición son los siguientes:

- miricetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición

- quercetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- kaempferol: entre 0,01 y 2 mg / g de la composición.

En una realización preferida de la invención, la composición de los azúcares comprendidos por las fibras dietéticas es la siguiente:

- 5 - azúcares neutros: entre 151,7 y 505 mg / g de la composición
- Ácidos urónicos: entre 1 y 100 mg / g de la composición
- Lignina Klason: entre 1 y 200 mg / g de la composición;

en el que los azúcares neutros comprendidos por la composición son los siguientes:

- celulosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- 10 • glucosa: entre 150 y 400 mg / g de la composición
- xilosa: entre 0,1 y 5 mg / g de la composición
- galactosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- arabinosa: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición
- manosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición

- 15 Todos los azúcares mencionados son preferiblemente las formas naturales de los azúcares, p/ej. RE- Glucosa.

En una realización preferida de la invención, la composición se obtiene a partir de un extracto seco de uva.

- 20 Un objeto adicional de esta invención es un suplemento dietario (nutricional) funcional caracterizado porque comprende la composición descrita anteriormente, en cualquiera de sus variantes, como un ingrediente funcional. La composición actúa directamente como un suplemento dietético funcional. El complemento dietético puede estar constituido en su totalidad (100% del total de la composición del suplemento) por la composición.

- 25 En otra realización preferida, dicho suplemento dietético se caracteriza porque comprende al menos entre 100 mg y 5 g de la composición, preferiblemente entre 500 mg y 2 g.

Preferiblemente, este suplemento dietético se caracteriza porque comprende, además de la composición como ingrediente funcional, al menos una sustancia fisiológicamente aceptable que tiene propiedades seleccionadas del grupo compuesto por: nutritivo, antioxidante, terapéutico, aromatizante, aromático, colorante u otras propiedades similares

También es preferible que la composición dietética comestible contenga adicionalmente al menos una sustancia seleccionada del grupo compuesto por: Vitaminas (Vitamina A, Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B3, Vitamina B6, Vitamina B9, Vitamina B12, Vitamina C, Vitamina E), elementos dietéticos traza (por ejemplo, zinc, cobre, magnesio, selenio, manganeso), fitoquímicos (por ejemplo, carotenoides, luteína, zeaxantina, astaxantina), colágeno, colágeno tipo II, Sulfato de Condroitina, Ácido Hialurónico, Ácidos Grasos Omega-3, Hidroxitol, Glutación, Glucosamina, extractos de fito enriquecidos con proantocianidinas y extractos fito de otros productos vegetales (como, opcionalmente, granada, té verde, oliva, *Polygonum cuspidatum*).

Tanto la composición descrita en esta especificación como el suplemento dietético que lo comprende (como ingrediente funcional) directamente pueden ser consumidos por los seres humanos. Como tal, el alcance de la presente invención incluye no sólo el uso de la composición como un suplemento dietético, sino también el uso de la composición como ingrediente funcional en alimentos o en una composición dietética.

De esta manera, tanto la composición como el suplemento nutricional o dietético descritos anteriormente, en cualquiera de sus variantes, pueden envasarse a granel o en dosis únicas. En general, la composición y el suplemento dietético pueden envasarse en latas, bidones, cajas de cartón o cualquier otro tipo de envase conocido en el campo. Cuando se envasan en dosis únicas, dicha composición y dicha composición que la comprenden pueden tomar la forma de una tableta, una cápsula o una píldora.

Se ha demostrado que el efecto de la composición descrita aquí, o de un suplemento dietético que comprende dicha composición, ofrece beneficios para la salud humana, especialmente con enfermedades relacionadas con el metabolismo de la glucosa y la mejora de los parámetros asociados con las enfermedades relacionadas con el metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, se ha demostrado cómo uno se beneficia del consumo de esta composición, o del suplemento dietético que lo contiene, por niveles reducidos de azúcar en la sangre y un metabolismo de la glucosa regulado al alza. El efecto ya es significativo incluso en dosis bajas.

La "regulación del metabolismo de la glucosa" se entiende como la regulación del procesamiento y / o captación de glucosa. Preferiblemente, la regulación del metabolismo de la glucosa da como resultado un aumento o reducción de al menos uno de los miARN circulantes seleccionados del grupo que comprende miARN-130a-3p, miARN-122-5p, miARN-34a-5p, miARN-191-5p y miARN-342-3p, preferiblemente al menos 2, 3, 4 de estos miARN, incluso más preferiblemente todos estos miARN. Los miARN tienen preferiblemente las secuencias de acuerdo con las SEQ-ID Nos. 1 a 5. Una regulación en el sentido de la invención se entiende como un cambio estadísticamente significativo en el nivel de un miARN circulante como se indica, por ejemplo, por un valor de $p < 0,05$ según se analizó mediante la prueba t para muestras individuales.

En una realización preferida, la regulación da como resultado al menos un cambio significativo en el nivel de miARN-191-5p y más preferiblemente en los niveles de miARN-191-5p y miARN-122-5p.

Un "miARN" (también llamado "microARN", "mir-", "miR-" o "micro ARN") es una pequeña molécula de ARN no codificante (que contiene aproximadamente 22 nucleótidos) que se encuentra en plantas, animales y algunos virus, y que funciona en el silenciamiento de ARN y la regulación postranscripcional de la expresión génica. Los miARNs funcionan a través del apareamiento de bases con secuencias complementarias dentro de moléculas de ARNm. Como resultado, estas moléculas de ARNm son silenciadas por uno o más de los siguientes procesos:

1) Rotura o escisión de la cadena de ARNm en dos partes, 2) desestabilización del ARNm a través del acortamiento de su cola de poli- Adenina (A) y 3) traducción menos eficiente del ARNm en proteínas en los ribosomas. Los miARN están bien conservados tanto en plantas como en animales, y se cree que son un componente vital y evolutivamente antiguo de la regulación genética. Se entiende por miARN circulante aquel miARN presente en sangre, suero sanguíneo o suero.

Influir en los niveles de miARN muestra una fuerte influencia de la composición en el metabolismo de la glucosa.

Dependiendo de la proposición metabólica, puede ser necesario determinar si la composición también muestra el efecto descrito en 1, 2, 3, 4 o 5 de los miARN previamente descritos en esta persona. El uso del compuesto puede estar restringido a estas personas.

El alcance de la presente invención incluye adicionalmente un producto alimenticio caracterizado porque su composición comprende como ingrediente funcional la composición descrita o el suplemento nutricional que se puede obtener del mismo, mezclado con al menos un ingrediente dietético. En una composición preferida del producto alimenticio, comprende como ingrediente dietético uno de los productos seleccionados del grupo formado por productos cárnicos, productos lácteos, derivados lácteos, salsas, pasta alimenticia, productos de panadería y pastelería, y similares, y cualquier combinación de los mismos.

En otra realización preferida, el producto alimenticio es una bebida, y la composición o el suplemento nutricional que lo comprende se mezcla con un líquido fisiológicamente aceptable.

Otro objeto de la presente invención es el uso de la composición descrita, o cualquiera de sus variantes, para la producción de diferentes productos funcionales. Estos productos incluyen alimentos y suplementos dietéticos para el consumo humano. Dicha composición puede usarse para regular el metabolismo de la glucosa. De esta manera, la composición de la presente invención se puede usar para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con trastornos en el metabolismo de la glucosa. El tratamiento o prevención resulta en un aumento del metabolismo de la glucosa. En realizaciones particulares, el trastorno del metabolismo de la glucosa es diabetes mellitus, especialmente diabetes tipo 2.

Aunque no se limita a ninguna ruta particular de administración o régimen de dosificación, se prefiere la administración oral.

La composición puede usarse en una dosificación de al menos 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g o 1,4 g por día.

Como límite superior, se prefiere una dosis de 8 g, 7 g, 6 g, 5 g, 4 g, 3 g o 2 g por día. Cada uno de estos límites se puede combinar como límite inferior y superior de una dosificación preferida.

Más preferido es una dosificación de 300 mg a 5 g por día, incluso más preferida una dosificación de 1 g a 2 g por día. La presente composición muestra efectos significativos incluso a dosis bajas, que pueden incluirse fácilmente en una dieta diaria.

Las dosis corresponden a un hombre o una mujer adulta, preferiblemente de una edad comprendida entre 25 y 65 años, preferiblemente mujeres adultas.

La persona a tratar es preferiblemente un hombre o una mujer adulta, preferiblemente de entre 25 y 65 años, más preferiblemente una mujer adulta.

La duración del tratamiento es preferiblemente de al menos 7 días, más preferiblemente de al menos 14 días, incluso más preferiblemente al menos 21 días.

- 5 La duración del tratamiento es al menos hasta que se pueda medir la primera regulación de efectos significativos del metabolismo de la glucosa como se mencionó anteriormente. Otro efecto adicional puede ser la mejora de los niveles de glucosa en ayunas. Más preferiblemente, los primeros efectos se miden después de al menos 21 días. Por lo tanto, el tratamiento puede finalizar o suspenderse después de 60 días, preferiblemente
10 después de 40 días.

El tratamiento puede usarse para reducir el riesgo de las enfermedades antes mencionadas en individuos sanos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

- Para una comprensión más completa de la presente invención, se establece una
15 referencia a la siguiente descripción realizada en relación con los dibujos adjuntos:

- Fig. 1.2 Cambios en los niveles de expresión de cinco miARN relacionados con el metabolismo de la glucosa en todos los voluntarios después de la ingesta de la composición. Los cambios de magnitud ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) expresaron las diferencias de miARN antes y después de consumir las cápsulas de composición. Las muestras se analizaron por triplicado. * indica valores significativamente diferentes de cero ($p < 0,05$) según se
20 analizaron mediante t-test para muestras individuales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- Aunque las presentes invenciones se han descrito e ilustrado junto con varias realizaciones específicas, los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse
25 variaciones y modificaciones sin apartarse de los principios de la invención tal como aquí se ilustra, describe y reivindica. Las presentes invenciones pueden incorporarse en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o características esenciales.

- Las realizaciones descritas se consideran en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas. El alcance de la invención, por lo tanto, se indica mediante las
30 reivindicaciones adjuntas, más que por la descripción anterior. Todos los cambios que se

encuentren dentro del significado y el rango de equivalencia de las reivindicaciones deben incluirse dentro de su alcance.

Materiales y métodos

Composición

- 5 La composición contenía altas cantidades de fibra dietética (659,7 mg / g de composición) y una concentración moderada de polifenoles totales (37,44 mg de ácido gálico / g de composición) (Tabla 1). Entre los compuestos fenólicos, se incluyeron diferentes ácidos fenólicos, flavonoles y flavanoles (Tabla 1). Otros parámetros químicos analizados en la composición fueron humedad (4,6%), proteína total (8,7%), grasa (0,8%) y ceniza
- 10 (20,7%). La composición, dispensada en cápsulas que contienen 700 mg de composición / cápsula. La composición podría obtenerse de uvas rojas utilizadas en el proceso de elaboración del vino, tal como se describe en Gil-Sánchez, I. (2017) para extraer L1. El contenido de azúcares basado en un residuo insoluble en alcohol de la composición se muestra en la tabla 4.
- 15 La materia prima para todos los extractos, fue el GP obtenido después del proceso de vinificación de vinos rosados o tintos. Las uvas rojas utilizadas en la elaboración del vino fueron todas de la variedad Tempranillo, cosechadas en viñedos ubicados en la Denominación de Origen Ribera de Duero. GP fresco se utilizó como materia prima y se sometió a un proceso de destilación para eliminar los compuestos aromáticos y el
- 20 alcohol. El residuo fue extraído a través del método de extracción tradicional sólido-líquido usando una solución hidroalcohólica (agua-etanol) como disolvente. La extracción de sólido-líquido se realizó mediante técnica de difusión. Una vez que se obtuvo el extracto polifenólico líquido, el producto resultante se centrifugó y se estabilizó para desplazar posibles residuos sólidos. La solución rica en polifenoles se concentró y
- 25 finalmente se secó mediante un proceso de secado por pulverización (spray). La maltodextrina y el dióxido de silicio se usaron como agentes de encapsulación en el proceso de secado por pulverización. La humedad en el extracto fue de alrededor del 4.6%. También se puede llevar a cabo el proceso como se describe en ES2319032A1.

Análisis de flavanoles, ácidos fenólicos y flavonoles

- 30 La composición (50 mg) se extrajo con acetonitrilo al 50% (1 ml) en un baño ultrasónico durante 30 minutos y se centrifugó adicionalmente a 6700xg durante 5 minutos; el sobrenadante se recogió y el residuo fué sometido al mismo proceso otras tres veces. Los cuatro sobrenadantes se combinaron y se evaporaron a sequedad a presión

reducida. El residuo se recuperó en 1 ml de acetonitrilo-agua (25:75, v / v) y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución, mediante detección de diodo en serie, ionización por electropulverización / espectrometría de masas HPLC-DAD-ESI / MS) en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba cuaternaria y un detector de diodos en serie acoplado a una HPChemStation de procesamiento de datos (rev.A.05.04). El sistema HPLC se conectó a través de la salida de células del detector de diodos en serie a un espectrómetro de masas API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), que consta de una fuente ESI y un analizador de masas con trampa de iones triple cuadrupolo controlado por Analyst 5.1 software.

La separación se realizó en una columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μ m, 150 mm x 4,6 mm) a 35 ° C, usando (A) ácido fórmico al 0,1% y (B) acetonitrilo como disolventes, utilizando diferentes gradientes para el análisis de flavanoles y ácidos fenólicos (0% B a 8% B en 5 min y de 8 a 10% durante 20 min, 10-14,5% B durante 20 min, 14,5-60% B durante 10 min) y flavonoles (isocrático 15% B durante 5 min, 15-20% B durante 5 min, 20-35% B durante 10min, 35-50% B durante 10min, 50-60% B durante 7min), usando en ambos casos un índice de flujo de 0,5 mLmin⁻¹. Doble detección en línea se llevó a cabo por DAD a 280 y 370 nm como longitudes de onda preferidas. Los espectros de masas se registraron entre m / z 100 y m / z 1400 en el modo de ion negativo. El aire de grado cero sirvió como gas nebulizador (40 psi) y como gas turbo (400C°) para secado con disolvente (30 psi). El nitrógeno sirvió como cortina en (10psi) y gas de colisión (medio).

Los cuadrupolos se ajustaron a la resolución de la unidad y el detector de espectrómetro de masas se programó para realizar una serie de dos análisis consecutivos: un sondeo completo de alta sensibilidad (MS mejorada, EMS) y un análisis de ion de producto mejorado (EPI) para obtener el patrón de fragmentación del ion padre. Los parámetros EMS fueron: tensión de pulverización de iones 4500V, desclasamiento potencial (DP) -40V, potencial de entrada (EP) -7V y energía de colisión (CE) -20V; mientras que los ajustes de EPI fueron: DP -40V, EP -10V, CE -25V y CES 0V, para flavanoles y ácidos fenólicos; y: DP -40V, EP -10V, CE -25V y CES 0V, para flavonoles.

Los compuestos fenólicos se caracterizaron de acuerdo con su absorción y espectros de masas y tiempos de retención en comparación con una biblioteca de datos, así como con estándares auténticos cuando estuvieron disponibles. Los compuestos se cuantificaron a partir de las áreas de sus picos cromatográficos registrados a 280 nm (ácidos fenólicos y flavanoles) y 370 nm (flavonoles). Para la cuantificación del compuesto, se obtuvieron

curvas de calibración para catequina, epicatequina, uercetina, ácido gálico y ácido elágico. Los flavonoles se expresaron como equivalentes de quercetina y los dímeros de procianidina como epicatequina. Todas las muestras se analizaron por triplicado, y los resultados se expresaron en miligramos de compuesto fenólico por gramo de extracto (producto seco por pulverización).

Análisis de antocianinas

Se extrajeron muestras (50 mg) usando ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA)-acetonitrilo (1:1, v / v) (1 ml) en un baño ultrasónico durante 30 minutos y se centrifugó adicionalmente a 6700xg durante 5 minutos; el sobrenadante se recogió y el residuo se sometió al mismo proceso otras tres veces. Todos los sobrenadantes se combinaron y se evaporaron a sequedad a presión reducida. El residuo se recuperó en 1 ml de TFA al 0,1% -acetonitrilo (75:25, v/v) y se analizó por HPLC-DAD-ESI/MS. Se utilizó una columna AQUA (Phenomenex) C18 (5µm,150mmx4,6mm) a 35°C. Los disolventes fueron (A) 0,1% TFA y (B) acetonitrilo, con el siguiente gradiente de elución establecido: isocrático 10% B durante 5 min, 10-15% B en 15 min, isocrático 15% B durante 5 min, 15-18% B durante 5 minutos, 18-35% de B durante 20 min, 35-60% de B durante 7 min. El índice de flujo fue de 0,5 mLmin⁻¹. DAD se llevó a cabo a 280 y 520nm. Los espectros de masas se registraron entre m/z 100 y m/z 900 en el modo de iones positivos. El aire de grado cero sirvió como nebulizador (50 psi) y gas turbo (600 °C) para secado con solvente (40 psi). El nitrógeno era la cortina (10 psi) y el gas de colisión (alto). EMS y el análisis EPI también se llevaron a cabo. Los parámetros del modo EMS fueron: voltaje de pulverización de iones 5000V, DP 55V, EP 4V y CE 10V; Los parámetros de EPI fueron: DP 5541V, EP 4V y CE 10V y dispersión de energía de colisión (CES) 0V.

Análisis de los componentes de la pared celular

De cada extracto, los residuos insolubles en alcohol (RIA) se obtuvieron sumergiendo las muestras en etanol (96%) a 60 °C y homogeneizando con un mezclador durante 5 minutos. Los materiales se filtraron a través de un filtro de vidrio sinterizado (No.3, Scientific Furnishingsltd, Chichester, Reino Unido) y se volvieron a extraer dos veces durante 1 minuto en etanol al 96% a 20 °C y se volvieron a filtrar.

Los residuos se volvieron a suspender en alcohol absoluto (dos veces) y acetona (dos veces), filtrando entre veces, y luego secados al aire, después de lo cual se almacenaron en un recipiente sellado a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron en miligramos de RIA por gramo de extracto (producto seco por pulverización). La

cantidad de RIA corresponde a la cantidad de fibra dietética del extracto tal como se usa en la presente memoria descriptiva.

- Los polisacáridos presentes en los RIA se extrajeron y la composición química de cada fracción se determinó. Los RIA se sometieron a un tratamiento de 12molL^{-1} H_2SO_4 a temperatura ambiente durante 3 h, seguido de dilución a $0,6\text{molL}^{-1}$ H_2SO_4 hidrólisis a 100°C durante 3 h (columna HF en la tabla 4), y también a $0,6\text{molL}^{-1}$ H_2SO_4 hidrólisis en 100°C durante 3 h (columna HS en tabla 4). Ambos ácidos hidrolizados liberaron diferentes componentes de fibra dietética. Los residuos insolubles obtenidos después de realizar la hidrólisis ácida, utilizando 12molL^{-1} H_2SO_4 seguidos por $0,6\text{molL}^{-1}$ H_2SO_4 , se cuantificaron gravimétricamente como lignina de Klason. Los hidrolizados fueron pasados a través de una columna de resina de intercambio iónico AG4x4 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EE. UU.) para neutralizarlos. La composición de azúcares neutros de los hidrolizados se determinó por HPLC usando una columna de microguard (Aminex Carbo-P, Bio-Rad) en serie con una columna de análisis de carbohidratos (Aminex HPX-87P heavy metal, 300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad) operado con un índice de flujo de $0,5\text{mLmin}^{-1}$ usando un detector de índice refractiva. Se calcularon las cantidades de azúcares utilizando el software de la versión System Gold 7.0 después de la calibración con azúcares estándar (Sigma, St Louis, MO, EE. UU.). Antes de la neutralización, se añadió eritritol como estándar interno.
- El contenido de ácido urónico se determinó mediante el método colorimétrico de m-hidroxidifenilo usando ácido D-galacturónico como estándar.

Diseño de estudio de intervención humana

- El estudio de intervención se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del CSIC (Madrid, España). Todos los voluntarios dieron su consentimiento escrito informado antes de participar. El estudio involucró a 10 mujeres sanas (rango de edad 25-65 años, IMC $<25\text{ kg / m}^2$). Los participantes no padecían diabetes, hipertensión, dislipidemia, enfermedad inflamatoria aguda o crónica, enfermedad infecciosa, cáncer o un episodio cardiovascular previo al ingreso al estudio.

- No habían recibido ninguna terapia con antibióticos, prebióticos, probióticos, simbióticos o suplementos vitamínicos ni ningún otro tratamiento médico que pudiese influir en la microbiota intestinal durante los 6 meses antes del inicio del estudio o durante el estudio (incluido el período de lavado). Los voluntarios siguieron un período inicial de lavado de 10 días (línea de base) durante el cual mantuvieron una dieta baja en polifenoles.

Después de este período, los participantes recibieron instrucciones de tomar dos cápsulas por día de la composición (1400 mg de composición / día) en el desayuno durante 21 días. Por lo tanto, el consumo diario promedio de fibra y compuestos fenólicos, en el presente estudio, fue de 923,58 mg y 54,42 mg, respectivamente. Durante el período de intervención, también mantuvieron la restricción de alimentos ricos en polifenoles en la dieta. Los voluntarios completaron un cuestionario sobre sus hábitos dietéticos para verificar la dieta.

Expertos profesionales tomaron muestras de sangre de los voluntarios después de ayuno durante la noche, en tres momentos: (a) después del período de lavado inicial; (b) después de 14 días de consumo de la composición; y (c) al final de la intervención de composición (21 días). El suero se separó en alícuotas y se congeló inmediatamente a -80°C.

Medición de parámetros bioquímicos e inmunológicos en plasma

Los parámetros bioquímicos del suero se midieron en plasma usando un autoanalizador bioquímico automatizado en un laboratorio externo acreditado. Las pruebas incluyeron la medición de glucosa, ácido úrico, albúmina, enzimas hepáticas (transaminasa glutámica-oxaloacética (GOT), transaminasa glutámica-pirúvica (GPT) y gamma-glutamyl transferasa (γ -GT), metabolismo de los lípidos (colesterol total, colesterol de Lipoproteína de alta densidad (HDL), relación colesterol total / colesterol HDL, colesterol LDL, relación colesterol LDL / colesterol HDL y triglicéridos), proteínas (proteína C reactiva), hormonas basales (insulina y suero de leptina) y factor de necrosis tumoral (TNF- α). Los niveles de TNF- α se determinaron usando un kit ELISA ultrasensible de TNF- α humano (Invitrogen, Barcelona, España) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Todas las determinaciones se llevaron a cabo al menos por duplicado. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Análisis de miARNs circulantes en plasma

Extracción de ARN

El ARN total (incluido miARN) se extrajo de muestras de plasma correspondientes al tiempo inicial y de finalización (21 días) del período de intervención de la composición, siguiendo las instrucciones del kit de aislamiento de ARN miRCURY™ para Biofluidos (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). Después de la extracción, la concentración final de ARN total enriquecido en miARN se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop-1000

(Thermo Fisher Scientific Inc., España) y la pureza se evaluaron midiendo las relaciones de 260/280 nm y 260/230 nm. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta un análisis posterior. La ausencia de hemólisis en el suero se verificó por amplificación de miR23a y miR454 como controles.

5 Cribado de miARN utilizando paneles

Inicialmente, se analizó la expresión de miARN en plasma de los voluntarios # 8 y # 10. Doscientos ng de ARN total por panel se transcribieron de forma inversa usando el microARN PCR miRCURY LNA™ Universal RT y el kit de poliadenilación y síntesis de cADN (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca).

- 10 Para cada muestra, el cADN se diluyó, y se preparó una mezcla con 45 µl de cADN, 4455 µl de agua estéril libre de nucleasa y 4500 µl de sonda SYBR Green (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) y la mezcla se añadió a los paneles de PCR listos para usar (10 µL/pocillo). Los paneles de miARN humanos I y II v4.0 contienen 743 dianas de miARN diferentes y se usaron seis ensayos de genes de referencia (mirBase13) (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) para el examen de miARN. El protocolo de temperatura se realizó de la siguiente manera: activación enzimática a 95°C durante 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 60 seg. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un equipo de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Rache, Basilea, Suiza). Las curvas de fusión se analizaron después de la amplificación y los valores de Cq se calcularon usando un método de derivada segunda (LightCycler® 480 Software 1.5, Rache). Todas las reacciones se realizaron por triplicado. UniSp5 y UniSp3 IPC se utilizaron para la normalización de miARNs Panel I y II, respectivamente. Los datos se calcularon como cambio de magnitud, de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, donde $-\Delta\Delta Cq = (Cq_{miARN} - Cq_{UniSP})_{miARN \text{ después de la ingesta}} - (Cq_{miARN} - Cq_{UniSP})_{ctrl \text{ miARN antes de la ingesta}}$.

Los resultados finales expresan la diferencia de magnitud entre valores anteriores y posteriores a la ingesta (varianza).

validación de mARN

- 30 Después de la selección descrita anteriormente, seleccionamos cinco miARN circulantes humanos modulados (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-130a-3p y hsa-miR-191-5p) relacionado con el metabolismo de la glucosa, el estado de resistencia a la insulina y biomarcadores de la diabetes tipo 2 (T2D) (Hernández-Alonso, Giardina, Salas-Salvado, Arcelin y Bullo, 2016; Jiao et al., 2015;

Tome-Carneiro et al., 2013; Xiao et al., 2014; Ye et al., 2015) (Tabla 2). La detección PCR en tiempo real se realizó utilizando sondas específicas de ácido nucleico bloqueado (LNA™) SYBR (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca), siguiendo las instrucciones del fabricante en un instrumento LightCycler® 480 (Roche). El protocolo de temperatura se realizó de la siguiente manera: activación enzimática en 95 °C durante 10 minutos; 45 ciclos de 95 °C durante 15 seg. y 60 °C durante 60 seg. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y los valores de Cq y los cambios de magnitud se calcularon como se indicó anteriormente.

Análisis estadístico

- 10 Repetidas medidas del análisis de la varianza unidireccional ANOVA se realizaron para comparar los datos obtenidos de los voluntarios en los tres momentos (período de lavado y después de 14 y 21 días consumiendo la composición). Se realizó un análisis de varianza unidireccional entre grupos para estudiar los diferentes perfiles de miARN entre los sujetos. Las diferencias menos significativas en ambos casos se calcularon mediante el test de Tukey ($p < 0,05$). La relación entre la expresión de miARN y los niveles de glucosa en sangre en ayunas se investigó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

El programa STADISTICA 7.1 se usó para procesar estos datos. Finalmente, se realizó el análisis del componente principal (PCA) para resumir los cambios en los perfiles de miARN de los voluntarios. Estas pruebas se realizaron utilizando IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 23.0; Ar monk, NT: IBM Corp.

Resultados

Cumplimiento de la intervención

- El reclutamiento de voluntarios se llevó a cabo en el Instituto de Investigación en Ciencia de los Alimentos (CIAL), Madrid (España), y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del CSIC. Inicialmente, 11 mujeres sanas dieron su consentimiento informado por escrito, sin embargo, un participante abandonó el estudio después del período de intervención inicial de 14 días debido a razones personales.

En general, la composición fue bien tolerada por los voluntarios, sin embargo, dos participantes informaron episodios leves de aumento de gases intestinales y dispepsia.

Modulación de miARN por el suministro de la composición

Se analizó la regulación de los perfiles de expresión de miARN después del suministro de la composición en las muestras de plasma de los dos voluntarios que mostraron la mayor disminución en los niveles de glucosa (voluntarios # 8 y # 10). El cribado de microARN mostró algunos cambios en la expresión de varios miARN de los diferentes 734 miARN diana. En base a estos resultados preliminares, se seleccionaron cinco miARN relacionados con el metabolismo de la glucosa (miARN-130a-3p, miARN-122-5p, miARN-34a-5p, miARN-191-5p y miARN-342-3p) para análisis cuantitativos posteriores usando sondas LNATM en muestras de todos los participantes en el estudio. La Tabla 2 proporciona la información básica principal sobre los miARN estudiados en el conjunto de muestra.

En general, se observó una gran variabilidad en la expresión de los cinco miARNs (Figuras 1, 2), lo que revela grandes diferencias entre individuos. El miARN-130a-3p disminuyó significativamente después de la administración de suplementos en cinco de cada diez voluntarios (#6, #7, #8, # 9 y #10), tres de los cuales presentaron la mayor disminución de glucosa plasmática después de la intervención, mientras que fue significativamente aumentado en el caso del voluntario # 4 que mostró el menor efecto hipoglucemiante. El nivel de expresión de miARN-122-5p aumentó en tres voluntarios (#5, #6 y #8) mientras que disminuyó significativamente en otros cuatro (#2, #3, #7 y #10). En el caso de miARN-34a-5p, su expresión se modificó significativamente para el voluntario # 9, el cual sufrió una disminución significativa, y para los voluntarios # 8 y # 10, en quienes se observó un aumento. Se observó claramente una modificación significativa en el patrón de expresión de miARN-191-5p para todos los voluntarios. Específicamente, la tendencia general observada fue una disminución significativa en la expresión de este miARN (7 de cada 10 voluntarios). Sin embargo, la expresión aumentó significativamente en voluntarios # 8 y # 10, junto con el voluntario # 5. Finalmente, en el caso de miARN-342-3p, se observó un efecto antagonista significativo en su expresión en voluntarios # 1 y # 3 en comparación con # 8 y # 10.

A pesar de las grandes diferencias individuales observadas, los voluntarios # 8 y # 10 (que compartieron una disminución similar en los niveles de glucosa en sangre) mostraron la misma tendencia en el patrón de expresión de miARN para cuatro de los cinco miARNs analizados (miRNA-130a-3p , miARN-34a-5p, miARN-191-5p y miARN-342-3p) (figuras 1, 2).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para agrupar a los sujetos en relación con su patrón de expresión de miARN y los valores de glucosa. El análisis PCA

agrupó a los voluntarios # 8 y # 10, que estaban directamente relacionados con miARN191-5p, este miARN también se correlaciona negativamente con la varianza de la glucosa. Los patrones de voluntario # 2 parecen ser totalmente diferentes al resto de los voluntarios, manteniendo un vínculo directo con miARN-342-3p y miARN-130-3p.

5 Finalmente, el resto de los voluntarios se agruparon muy cerca.

Resultados

Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en los niveles de glucosa en sangre en ayunas después del suministro de la composición (desde 89,00 $\pm$ 1,84 mg / dL a 84,5 $\pm$ 2,61 mg / dL). La evidencia acumulada sugiere que los miARNs circulantes son

10 biomarcadores útiles para la regulación del metabolismo de la glucosa o la diabetes tipo 2.

La expresión de cinco miARNs específicos basados en la literatura relacionados con el metabolismo de la glucosa (incluyendo miARN-130a-3p, miARN-122-5p, miARN-34a-5p, miARN-191-5p y miARN-342-3p) se analizó en muestras de plasma por PCR en tiempo

15 real. Los cambios significativos ($p < 0,05$) en el perfil de miARN circulante después de la suplementación con la composición sugieren que la composición puede modular la expresión de miARNs, la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional y así participar en el metabolismo de la glucosa. Además, el análisis estadístico confirmó altas diferencias interindividuales ($p < 0,001$). Se ha encontrado previamente una

20 disminución en los niveles de expresión de miARN-342-3p en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2 (Collares et al., 2013; Fernández-Valverde, Taft y Mattick, 2011; Hezova et al., 2010). De acuerdo con estos estudios, el estudio encontró un aumento en los niveles de miARN-342-3p para los voluntarios # 8 y # 10. De forma similar, la expresión de miARN-191-5p disminuyó en pacientes con diabetes tipo 1 (Zampetaki et al., 2010). Los

25 voluntarios #8 y #1 mostraron una correlación negativa entre miARN-191-5p y niveles de glucosa en plasma (test de Pearson, $p = 0,003$). Se ha descrito en la literatura un efecto antagonico del miARN-34a-5p sobre el metabolismo de la glucosa, y se ha sugerido el miARN-34a-5p como marcador para diferenciar entre no diabéticos y pacientes con diabetes tipo-2 temprana (Kong et al., 2011; Rokavec, Li, Jiang y Hermeking, 2014). En el

30 estudio se observó un posible efecto protector en el caso del voluntario # 9, para el cual se observó una reducción significativa de miARN-34a- 5p, coincidente con la disminución del nivel de glucosa en sangre en este voluntario después del consumo de la composición. En contraste, los voluntarios # 8 y # 10, cuyos niveles de glucemia disminuyeron más, mostraron un aumento de miARN-34a-5p. Del mismo modo, estos

efectos antagónicos y las diferencias interindividuales también fueron detectadas en la expresión del miARN-122-5p (Fong et al., 2015).

Las diferencias interindividuales en los perfiles de miARN se han publicado ampliamente en la bibliografía (Flowers, Gadgil, Aouizerat y Kanaya, 2015; Geeleher, Huang, Gamazon, Golden y Seoighe, 2012; Ludwig et al., 2016; Lukiw, 2013) ya que los miARNs son reguladores específicos y precisos de la homeostasis del cuerpo. Sin embargo, las diferencias de miARN descritas anteriormente asociadas con el suministro de la composición podrían indicar que los efectos de la composición están mediados por la modulación de miARN.

- 5 10 La composición probada en el presente estudio no provocó ninguna disminución significativa en los niveles de colesterol total y colesterol LDL.

En conclusión, los resultados de la presente invención muestran que el suministro de la composición (1,4 g, 2 cápsulas / día) durante tres semanas condujo a una disminución significativa en los niveles de glucemia en ayunas. La regulación positiva in vivo de los miARNs relacionados con el metabolismo de la glucosa observada seguida al suministro de la composición sugiere un posible efecto beneficioso de la misma en el metabolismo de la glucosa, que contribuye a disminuir el riesgo de diabetes tipo 2. La composición puede considerarse un ingrediente funcional en el mantenimiento de la salud humana.

Tabla 1

	Composición
COMPOSICION FENOLICA (mg/g extracto)	
Polifenoles Totales (mg ácido gálico/g)	37,44
Ácidos Fenólicos	
ácido elágico	5,64±0,65
Flavanoles	
Catequina	0,28±0,07
Epicatequina	1,03±0,25
Proantocianidina	4,62
Flavonoles	
Miricetina	0,26±0,01
Quercetina	0,34±0,03
Kaempferol	0,16±0,00
COMPOSICION RESIDUO INSOLUBLE ALCOHOL	
(mg/g RIA)	
RIA Rdto Total	660
Azúcares Neutros	294,7
Ácidos Urónicos	32,3±1,0
Azúcares Totales	328,2
Lignina Klason	84,3±1,1

Tabla 2

miARN	Secuencia	Implicación en el metabolismo de la glucosa	Referencias
hsa-miR-122-5p Seq-ID No. 1	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	↑: implicado en síndrome metabólico y diabetes tipo-2 ↑: baja consumo de glucosa en cáncer de pecho. ↓: Resistencia hepática a la insulina.	Willeit et al. (2016), Fong et al. (2015)
hsa-miR-34a-5p Seq-ID No. 2	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	Actúa sobre dianas relacionadas con señalización de insulina y desarrollo del páncreas. ↑: en islotes pancreáticos en pacientes diabetes tipo-2 ↑: Metabolismo dañado de la glucosa	Rottiers and Naar (2012), Kong et al. (2011), Rokavec et al. (2014)
hsa-miR-342-3p Seq-ID No. 3	UCUCACACAGAAAU CGCACCCGU	↓: diabetes tipo-1 y 2, y diabetes gestacional	Fernandez-Valverde et al. (2011), Collares et al. (2013)
hsa-miR-130a-3p Seq-ID No. 4	CAGUGCAAUGUUAAAAGGCAU	↓: diabetes tipo-2 ↑: aumenta en la señalización por insulina.	Ye et al. (2015), Jiao et al. (2015), Xiao et al. (2014)
hsa-miR-191-5p Seq-ID No. 5	CAACGGAAUCCCCAAAAGCAGCUG	↓: diabetes tipo-1	Zampetaki et al. (2010)

Tabla 3

		Antes toma Comp,	Después 14 días toma comp,	Después 21 días toma comp,
Bioquímica	Glucosa (mg/dl)	89,00±1,84 ^b	87,10±1,66 ^{a,b}	84,50±2,61 ^a
	Acido Úrico (mg/dl)	4,48±0,35	4,49±0,30	4,24±0,29
	Albumina (mg/dl)	4,46±0,05	4,34±0,04	4,49±0,07
Enzimas	ASAT GOT (UI/l)	19,10±0,62	20,70±2,55	19,90±1,73
	ALAT GOT (UI/l)	17,00±2,21	21,80±6,82	20,30±2,76
	Gamma-GT (UI/l)	13,30±1,13	11,10±1,31	11,60±1,56
Metabolismo Lipídico	Colesterol Total (mg/dl)	201,60±7,70	196,90±8,21	198,50±9,00
	Trigliceridos (mg/dl)	82,50±18,36	87,2±19,22	91,10±19,93
	HDL Colesterol (mg/dl)	59,40±4,30	59,20±3,55	58,60±4,00
	Tot, Col./HDL Col	3,57±0,34	3,49±0,37	3,56±0,36
	LDL Colesterol (mg/dl)	125,40±6,19	120,10±6,63	121,60±7,22
	LDL Col/HDL Col	2,25±0,24	2,15±0,26	2,20±0,26
Proteínas	Proteína C-reactiva (mg/l)	3,82±1,79	2,85±1,55	2,60±1,57
Hormonas Basales	Insulina (μUI/ml)	9,44±1,88	10,15±1,93	10,52±2,30
	Leptina Sérica(ng/ml)	12,12±2,61	11,05±19,93	11,47±2,27
Marcadores Inmuno	TNF-α (pg/ml)	7,20±0,68	8,01±0,65	7,73±0,33

^aSignifica ± error estandar cuando es calculado. ^bValores seguidos por diferentes códigos de letras son significantivamente diferentes (p<0.05) de acuerdo con el test LSD test. La letra 'a' se asigna al valor mas bajo.

Tabla 4

(mg/g RIA)	HF	HS
Azúcares Neutros		
Celulosa	4,1	11,0
Glucosa	258,2	268,8
Xylosa	0,5	0,4
Galactosa	5,2	6,0
Arabinosa	1,9	2,8
Manosa	6,8	5,7
Ácidos uronicos	32,2	32,3
Azúcares Totales	328,2	328,2
Lignina Klason	84,3	-
Rdto RIA	659,7	659,7

Referencias

- Charalampia, D., & Koutelidakis, A. (2016). Grape Pomace: A Challenging Renewable Resource of Bioactive Phenolic Compounds with Diversified Health Benefits. *Food Processing & Technology*, 3(1), 00065.
- Collares, C. V., Evangelista, A. F., Xavier, D. J., Rassi, D. M., Arns, T., Foss-Freitas, M. C., Donadi, E. A. (2013). Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Research Notes*, 6, 491.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342.
- Fernandez-Valverde, S. L., Taft, R. J., & Mattick, J. S. (2011). MicroRNAs in beta-cell biology, insulin resistance, diabetes and its complications. *Diabetes*, 60(7), 1825-1831.
- Flowers, E., Gadgil, M., Aouizerat, B. E., & Kanaya, A. M. (2015). Circulating micrnas associated with glycemic impairment and progression in Asian Indians. *Biomarker research*, 3, 22.
- Fong, M. Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A. Y., Chandra, M., Ashby, J., Wang, S. E. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nature cell biology*, 17(2), 183-194.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987-9003.
- Geeleher, P., Huang, S. R., Gamazon, E. R., Golden, A., & Seoighe, C. (2012). The regulatory effect of miRNAs is a heritable genetic trait in humans. *BMC Genomics*, 13, 383.
- Gil-Sanchez, I., Ayuda-Duran, B., Gonzalez-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Cueva, C., Martin-Cabrejas, M. A., . . . Bartolome, B. (2017). Chemical characterization and in vitro colonic fermentation of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3433-3444.
- Jiao, Y., Zhu, M., Mao, X., Long, M., Du, X., Wu, Y., Li, L. (2015). MicroRNA-130a expression is decreased in Xinjiang Uygur patients with type 2 diabetes mellitus. *American journal of translational research*, 7(10), 1984-1991.
- Hernandez-Alonso, P., Giardina, S., Salas-Salvado, J., Arcelin, P., & Bullo, M. (2016). Chronic pistachio intake modulates circulating microRNAs related to glucose metabolism

- and insulin resistance in prediabetic subjects. *European journal of nutrition*. doi: 10.1007/s00394-016-1262-5
- Hezova, R., Slaby, O., Faltejskova, P., Mikulkova, Z., Buresova, I., Raja, K. R., Michalek, J. (2010). microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cellular immunology*, 260(2), 70-74.
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Zhao, L. (2011). Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta diabetologica*, 48(1), 61-69. doi: 10.1007/s00592-010-0226-0
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., Keller, A. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic acids research*, 44(8), 3865-3877.
- Lukiw, W. J. (2013). Variability in micro RNA (miRNA) abundance, speciation and complexity amongst different human populations and potential relevance to Alzheimer's disease (AD). *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 133. doi: 10.3389/fncel.2013.00133
- Rokavec, M., Li, H., Jiang, L., & Hermeking, H. (2014). The p53/miR-34 axis in development and disease. *Journal of molecular cell biology*, 6(3), 214-230. doi: 10.1093/jmcb/mju003
- Rottiers, V., & Naar, A. M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 239-250.
- Tome-Carneiro, J., Larrosa, M., Yanez-Gascon, M. J., Davalos, A., Gil-Zamorano, J., Gonzalez, M., Garcia-Conesa, M. T. (2013). One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacological research*, 72, 69-82.
- Urquiaga, I., D'Acuna, S., Perez, D., Dicenta, S., Echeverria, G., Rigotti, A., & Leighton, F. (2015). Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: a randomized controlled trial. *Biological research*, 48, 49. doi: 10.1186/s40659-015-0040-9
- Willeit, P., Yin, X., Kaudewitz, D., Skroblin, P., Zampetaki, A., Moschen, A. R., Mayr, M. (2016). Circulating microRNA-122 is associated with incident metabolic syndrome and type-2 diabetes. *Atherosclerosis*, 252, e263. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.098
- Xiao, F., Yu, J., Liu, B., Guo, Y., Li, K., Deng, J., Guo, F. (2014). A novel function of microRNA 130a-3p in hepatic insulin sensitivity and liver steatosis. *Diabetes*, 63(8), 2631-2642.

Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221-237.

Yubero, N., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Villanueva, S., Carrion, J. M., Larrarte, E., & Moro, C. (2013). LDL cholesterol-lowering effects of grape extract used as a dietary supplement on healthy volunteers. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(4), 400-406.

Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, M. (2010). Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation research*, 107(6), 810-817. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226357

Listado de Secuencias

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) ; Bodegas Matarromera S.L.

<120> Composición para la regulación del metabolismo de la glucosa

5 <130> 43842

<160> 5

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 22

10 <212> ARN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> hsa-miR-122-5p

<400> 1

15 uggaguguga caaugguguu ug 22

<210> 2

<211> 22

<212> ARN

<213> Homo sapiens

20 <220>

<223> hsa-miR-34a-5p

<400> 2

uggcaguguc uuagcugguu gu 22

<210> 3

25 <211> 23

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> hsa-miR-342-3p
 <400> 3
 ucucacacag aaaucgcacc cgu 23
 <210> 4
 5 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> hsa-miR-130a-3p
 10 <400> 4
 cagugcaaug uuaaaagggc au 22
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ARN
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> hsa-miR-191-5p
 <400> 5
 caacggaauc ccaaaagcag cug 23
 20

REIVINDICACIONES

1. Composición para regular el metabolismo de la glucosa que comprende como ingredientes activos los siguientes componentes:
- 5 a) uno o más polifenoles a una concentración de entre 0,5 y 100 mg / g de la composición;
- b) fibras dietéticas, en donde las fibras dietéticas comprenden uno o más azúcares o derivados de los mismos a una concentración de 50 a 600 mg / g en base a la composición.
- 10 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que uno o más polifenoles comprenden ácido elágico, flavanoles o flavonoles o cualquier combinación de los mismos.
- 15 3. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que los azúcares comprenden azúcares neutros y ácidos urónicos.
- 20 4. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que los azúcares neutros se seleccionan del grupo que comprende celulosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa y cualquier combinación de los mismos.
5. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque comprende la siguiente concentración de polifenoles en peso:
- 25 - ácido elágico: entre 0,5 y 10 mg / g de la composición
- flavanoles: entre 0,2 y 20 mg / g de la composición
- flavonoles: entre 0,11 y 12 mg / g de la composición.
- 30 6. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque los azúcares comprendidos por las fibras dietéticas son los siguientes:
- azúcares neutros: entre 150 y 550 mg / g de la composición
- Ácidos urónicos: entre 1 y 100 mg / g de la composición
- Lignina Klason: entre 1 y 200 mg / g de la composición.
- 35 7. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizada porque los azúcares neutros comprendidos por la composición son los siguientes:
- celulosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- glucosa: entre 150 y 400 mg / g de la composición
- xilosa: entre 0,1 y 5 mg / g de la composición
- 40 - galactosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- arabinosa: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición
- manosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición.
- 45 8. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque la composición se usa en una dosificación de hasta 8 g por día.

9. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la regulación del metabolismo de la glucosa da como resultado un aumento o una disminución de al menos uno de los miARN circulantes seleccionados del grupo que comprende miARN130a. -3p, miARN-122-5p, miARN-34a-5p, miARN-191-5p y miARN-342-3p.
10. Suplemento dietético que comprende la composición descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como ingrediente funcional.
11. Suplemento dietético según la reivindicación 10, caracterizado porque comprende entre 100 mg y 5 g de la composición.
12. Producto alimenticio caracterizado porque su composición comprende como ingrediente funcional la composición descrita en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el suplemento dietético descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 mezclados junto con al menos un ingrediente dietético.
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para tratar o prevenir el trastorno del metabolismo de la glucosa o enfermedades relacionadas con el mismo.
14. Uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la producción de productos funcionales para el consumo humano.

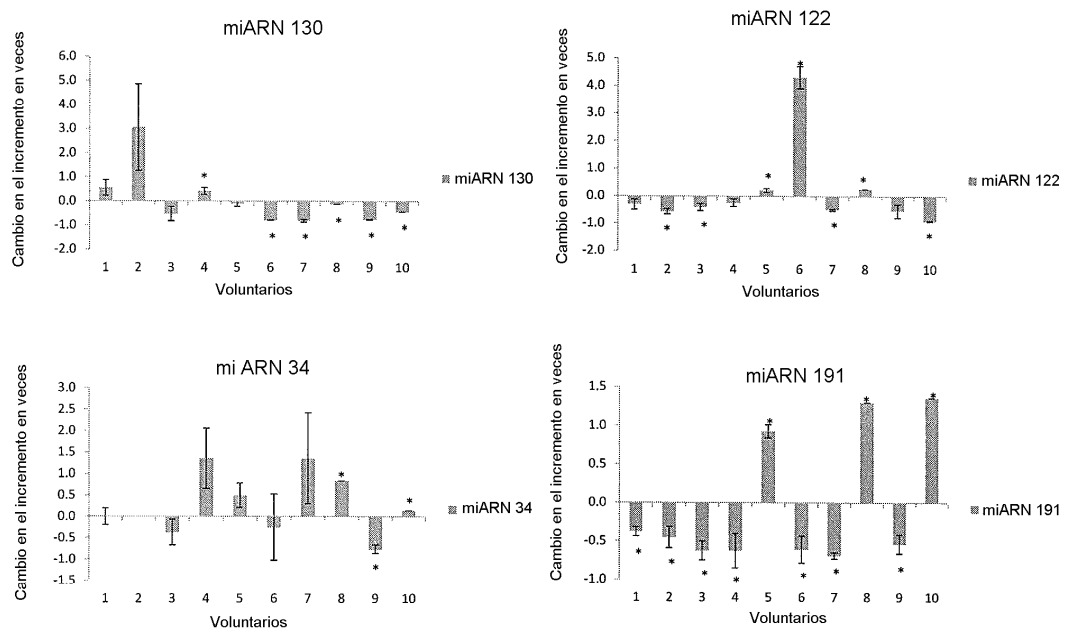


Fig. 1

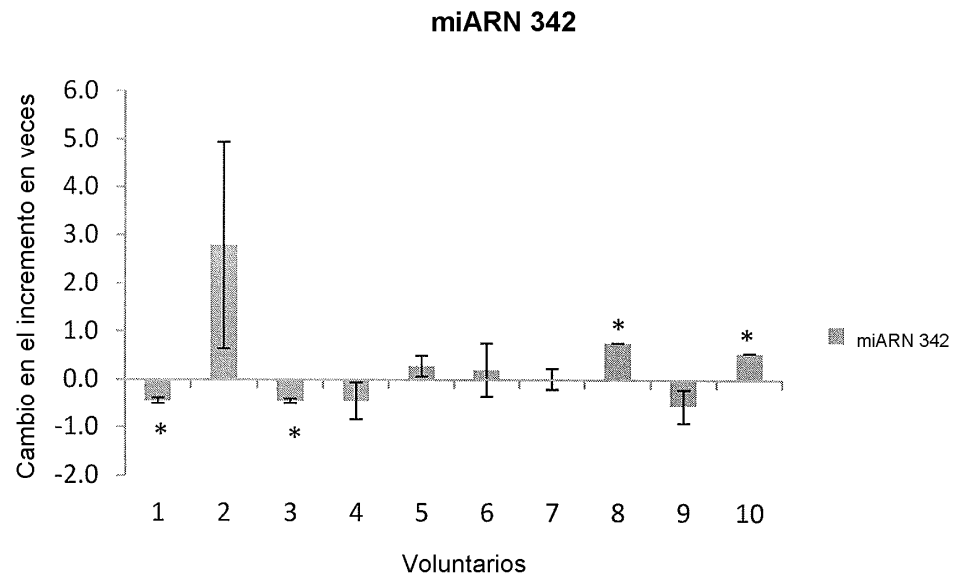


Fig. 2



- ②① N.º solicitud: 201830227
②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.03.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2016085321 A2 (INQPHARM GROUP SDN BHD [MY/MY]) 02/06/2016, página 5, línea 16 – página 11, línea 5; página 27, líneas 10-15; Reivindicaciones 1-11, 19, 20, 31, 40.	1-8, 10-14
X	HANHINEVA K <i>et al.</i> Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. International Journal of Molecular Sciences. 2010. Vol. 11, Páginas 1365-1402, todo el documento, principalmente resumen y páginas 1366-1369, 1382-1383.	1-8, 10-14
X	WO 2013021076 A1 (ABRO BIOTEC S.L.[ES/ES]) 14/02/2013, Página 10, línea 32 – página 11, línea 21; página 14, línea 33 – página 16, línea 21.	1-8, 10-12, 14
X	JIANMEI YU1 & MOHAMED AHMEDNA. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. International Journal of Food Science and Technology , 2013, Vol. 48, Páginas 221-237, resumen; página 221, columna 2; página 222, columna 1, página 229, columnas 1-2; página 231, columna 1 página 232, columna 2.	1-8, 10-14
X	ES 2205207 T3 (THE HOWARD FOUNDATION) 01/05/2004, Página 8, líneas 21-60; reivindicaciones 1-6.	1-8, 10-12, 14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.08.2018

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/05 (2006.01)

A61K31/70 (2006.01)

A61P3/08 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.