

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 929**

51 Int. Cl.:

A61K 36/48 (2006.01)

A23L 33/105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2006** **PCT/EP2006/012012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.0007** **WO07071334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2006** **E 06829580 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 1962877**

54 Título: **Extractos de *Phaseolus vulgaris* precipitados con etanol, su uso y formulaciones**

30 Prioridad:

22.12.2005 IT MI20052450

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

25.03.2021

73 Titular/es:

INDENA S.P.A. (100.0%)

Via Ortles, 12

20139 Milano, IT

72 Inventor/es:

BERLANDA, DAVIDE;

BERTANI, MARCO;

BOMBARDELLI, EZIO;

DONZELLI, FABIO;

GARDI, ANDREA y

PONZONE, CESARE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 813 929 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

Extractos de *Phaseolus vulgaris* precipitados con etanol, su uso y formulaciones**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a los extractos obtenidos de las semillas de plantas del género *Phaseolus*, y el procedimiento de su preparación.

Más concretamente, la presente invención se refiere a los extractos de semillas de *Phaseolus vulgaris*, que se caracterizan por su contenido en inhibidores de la α -amilasa y fitohemaglutininas en proporciones establecidas que reducen la absorción de la glucosa originada en los almidones de la dieta, y reducen el apetito tras su administración repetida.

Técnica anterior

El inhibidor de la α -amilasa (α AI) es una glicoproteína contenida en las semillas de las judías (*Phaseolus vulgaris*) que inhibe la actividad enzimática de la amilasa de origen animal, y especialmente de la amilasa humana, de manera diferenciada y dependiente de la especie. Este inhibidor, que fue purificado por primera vez por Marshall y Lauda en 1974 (J. Biol. Chem., 250 (20), 8030-8037, 1975), ha despertado interés por los efectos que su actividad inhibidora de la amilasa pancreática puede ejercer sobre la absorción intestinal de la glucosa (derivada de la hidrólisis enzimática del almidón) y, sobre todo, por su posible aplicación en la industria alimentaria. Los carbohidratos son una importante fuente de calorías y contribuyen a la síntesis de las grasas en las personas con predisposición a la obesidad o la diabetes de tipo II. En la naturaleza, en la evolución de la especie, la disponibilidad de alimentos para la supervivencia era intermitente, por lo que la capacidad de acumular energía en exceso de la cantidad necesaria para su uso inmediato era esencial. Las células adiposas, desarrolladas en diferentes partes del cuerpo, se encuentran entre los lugares donde se acumula la energía, de manera que está fácilmente disponible cuando el cuerpo la necesita. Este sistema fisiológico, orquestado por las secreciones endocrinas y neuronales, permite a los seres humanos sobrevivir durante largos períodos, incluso en ausencia de alimentos. Sin embargo, en caso de alimentación abundante, de sedentarismo y de razones genéticas asociadas al estilo de vida de los países industrializados, el sistema aumenta de forma incontrolada los depósitos de energía adiposa con consecuencias adversas, como el defecto de belleza, seguido de una sobrecarga del sistema cardiocirculatorio. Uno de los principales problemas es la obesidad, que ha alcanzado niveles elevados en algunos países, como los Estados Unidos de América. La obesidad es la principal causa de enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes. El exceso de peso, que es común tanto en hombres como en mujeres, hace que el sujeto consuma cada vez más alimentos y el resultado es un deterioro de la salud. Dado que el exceso de glucosa en la sangre provoca un aumento de los depósitos de energía, la disponibilidad de sustancias que reducen la absorción de la glucosa es muy importante.

La demanda mundial de sustancias contra la obesidad ha llevado a la investigación y el estudio de alimentos que contrarrestan la progresiva acumulación de peso corporal.

A Los inhibidores de la amilasa han sido identificados desde hace mucho tiempo en diferentes legumbres y maíz, y se han realizado ensayos clínicos específicos en los últimos años, con resultados mixtos. Según el procedimiento de preparación utilizado para la concentración y el aislamiento de esos inhibidores, los resultados han sido contradictorios, ya que muchos preparados comerciales demostraron carecer de actividad efectiva *in vivo*. Según los primeros estudios de Layer, Carlson y Di Magno (Gastroenterología, 88(6): 1895, 1902, 1985), este problema se debe aparentemente al alto grado de dilución del inhibidor en preparados altamente impuros; de hecho, se ha demostrado que los preparados de inhibidor purificado son activos en α -amilasa cuando se introducen directamente en el lumen intestinal.

Los procedimientos fragmentarios descritos en la literatura para la preparación de los inhibidores de la α -amilasa implican la extracción con tampón fosfato y la insolubilización de las proteínas con sulfato de amonio, y no proporcionan ninguna selectividad. Los extractos obtenidos contienen altas concentraciones de fitohemaglutininas y deben ser diluidos para obtener extractos con un nivel de toxicidad aceptable. Aparte del aspecto biológico, los procedimientos conocidos incluyen algunas etapas que dificultan la preparación de un producto que sea a la vez activo y seguro. Los problemas que surgen durante la extracción con tampones de diferente fuerza iónica y pH se deben a la alta concentración de contaminantes de proteínas y polisacáridos, que los hacen muy viscosos, lo que da lugar a problemas de baja filtrabilidad y a tiempos de procesamiento más largos. Como se trata de extracciones acuosas, existe también un alto riesgo de contaminación microbiana del extracto de proteína, que es difícil de controlar, especialmente en el caso de los preparados altamente viscosos. Todas estas condiciones conducen a una pérdida de producto y dificultan la obtención de extractos finales con un bajo título de fitohemaglutinina y la correspondiente estandarización multicomponente. Se han utilizado diversos procedimientos para resolver el problema de la limitación de las fitohemaglutininas, incluidos los tratamientos térmicos, que conducen a la descomposición no sólo de las fitohemaglutininas, sino también de los inhibidores de la α -amilasa, con el resultado de que los productos obtenidos son escasamente activos. En la práctica, los productos que se comercializan tienen un contenido muy bajo de α AI. Otros productos demasiado enriquecidos en inhibidores de la amilasa α causan desagradables problemas de flatulencia cuando se administran en grandes dosis.

Descripción de la invención

Los productos según la invención se preparan por extracción con un medio acuoso o hidroetanol y precipitación con mezclas adecuadas de etanol y agua.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de mezclas hidroetanólicas en extractos acuosos de frijol adecuadamente concentrados produce extractos enriquecidos con un contenido de inhibidor de la α -amilasa que tiene una actividad de entre 1.000 y 1.600 USP/mg (título de HPLC de entre 6 y 14% p/p) y un contenido de fitohemaglutinina de entre 8.000 y 30.000 HAU/g, por lo que puede formularse en productos para uso dietético a dosis suficientemente bajas para obtener el resultado deseado. Además de esta importante ventaja, el procedimiento al que se refiere la invención produce una reducción significativa del número de microbios. Otra ventaja considerable es la posibilidad de obtener un producto final enriquecido en (α AI) inhibidor, con relaciones de fitohemaglutinina definidas.

El procedimiento de la invención comprende la extracción de la biomasa con tampones que tienen un pH que oscila entre 3 y 6,5, preferentemente un pH de 3,5-5,5, e incluso más preferentemente un pH 4, a temperaturas de entre 2 y 25°C, y preferiblemente entre 4 y 18°C, y la posterior separación del extracto de la biomasa por centrifugación.

Los tampones adecuados para la extracción suelen ser tampones de fosfato, citrato o acetato o tampones de aminoácidos dicarboxílicos, preferentemente de fosfato o citrato. Las mezclas de agua-alcohol tamponadas también pueden utilizarse como disolvente de extracción.

Según los extractores utilizados y el ciclo de extracción, se utilizan de 5 a 20 volúmenes de tampón por parte de la droga, preferiblemente de 10 a 12,5 partes, y la mezcla se remueve durante 1 a 4 horas, preferiblemente 2 horas; la biomasa puede extraerse tres veces más con una cantidad adecuada de tampón, y en cualquier caso hasta que se agote su contenido de inhibidor de la amilasa y fitohemaglutinina α .

Los extractos combinados se clarifican por filtración o centrifugación y se concentran en el vacío a una temperatura de entre 25° y 35°C, preferentemente 30°C, o por ultrafiltración (corte de 10.000 Da) hasta un volumen correspondiente a aproximadamente el 10% del peso del extracto después de la centrifugación.

El extracto acuoso concentrado se precipita luego con etanol añadido a una concentración final de entre 60 y 70% v/v, preferentemente 65% v/v, operando a una temperatura de entre 18° y 30°C, y preferentemente entre 20° y 25°C.

El precipitado obtenido puede ser centrifugado y/o filtrado, redisuelto en agua desmineralizada y reprecipitado en un 60% de etanol para reducir la parte salina. Alternativamente, puede ser diafiltrado a través de una membrana con un corte de 10.000 Da. El sedimento de la precipitación, que constituye el extracto según el invento, se seca.

Si se utilizan estos procedimientos, se puede obtener un extracto con las siguientes características:

- Título de HPLC: $\geq 6\% \leq 14\%$ p/p
- actividad inhibidora de la α -amilasa: $\geq 1.000 \leq 1.600$ USP/mg
- Actividad hemoaglutinante: $\geq 8.000 \leq 30.000$ HAU/g

La eficacia de los extractos se ha ensayado en ratas tratadas con dosis de 200 y 400 mg/Kg al día, con libre acceso al alimento consistente en una dieta especial enriquecida con almidón. Durante el tratamiento los extractos según la invención reducen el consumo de alimentos de manera significativa, mientras que el consumo de agua permanece inalterado.

El producto, según la invención, es perfectamente tolerado, y puede ser incorporado a formulaciones farmacéuticas o de dieta en dosis que oscilan entre 50 y 1.000 mg, para ser tomadas en las comidas principales. El extracto puede ser incorporado en formas bebibles o similares, para ser tomadas como supresores del apetito.

Los ejemplos que se presentan a continuación ilustran la preparación y las ventajas de la invención.

EJEMPLO 1: Preparación de un extracto de judías enriquecido con α AI obtenido por extracción con tampón de citrato y precipitación con etanol.

Una suspensión de 150 g de harina de frijol en 1,5 L de ácido cítrico 5,75 g/L se agitó durante 3 horas a +4°C.

La suspensión fue centrifugada, y el centrifugado acuoso se concentró 7,5 veces (residuo seco: 15,0% p/p). El concentrado se diluyó con un 95% de etanol hasta una concentración del 65% de etanol para obtener un precipitado que se recuperó por centrifugación a +22°C. El sólido recogido se secó al vacío a una temperatura no superior a 50°C. El producto obtenido (rendimiento 2,36%) tenía una actividad inhibidora de la amilasa de 1.050 U/mg, una actividad hemaglutinante de 9.000 HAU/g, y un título de HPLC de 7,3% p/p.

EJEMPLO 2: Preparación de un extracto de judías enriquecido con α AI obtenido por extracción con tampón de citrato y precipitación con etanol

Una suspensión de 150 g de harina de frijol en 1,5 L de ácido cítrico 5,75 g/L se agitó durante 2 horas a +22°C.

La suspensión fue centrifugada, y el centrifugado acuoso se concentró 10,5 veces (residuo seco: 17,1% p/p). El concentrado se diluyó con un 95% de etanol hasta una concentración del 65% de etanol para obtener un precipitado que se recuperó por centrifugación a +22°C. El sólido recogido se secó al vacío a una temperatura no superior a 50°C. El producto obtenido (rendimiento 3,5%) tenía una actividad inhibidora de la amilasa de 1.600 U/mg, una actividad hemaglutinante de 18.600 HAU/g y un título de HPLC de 10,0% p/p.

5

EJEMPLO 3: Preparación de un extracto de judías enriquecido con α AI obtenido por doble extracción con solución hidroalcohólica (30% de etanol) de ácido cítrico y precipitación con etanol.

Una suspensión de 100 g de harina de frijol en 1,0 L de una mezcla 70:30 de agua y etanol, que contiene ácido cítrico 4,6 g/L, se agitó durante 2 horas a +22°C.

10

La suspensión se centrifugó, la fase líquida clara se descartó, y el sedimento se sometió a un nuevo ciclo de extracción con 750 mL de agua. La fase líquida de la segunda extracción se combinó con la primera, y se concentró 4,3 veces (residuo seco: 4,78% p/p). El concentrado se diluyó con un 95% de etanol hasta una concentración del 70% de etanol para obtener un precipitado que se recuperó por centrifugación a +22°C. El sólido recogido se secó al vacío a una temperatura no superior a 50°C. El producto obtenido (rendimiento 0,88%) tiene una actividad inhibidora de la amilasa de 1.570 U/mg, una actividad hemaglutinante de 27.000 HAU/g, y un título de HPLC de 13,6% p/p.

15

REIVINDICACIONES

1. Extracto obtenible por extracción a partir de semillas de *Phaseolus vulgaris* con mezclas de etanol y agua, **caracterizado por** un contenido de inhibidor de la α -amilasa entre 1.000 y 1.600 USP/mg (título de HPLC entre 6 y 14% p/p) y un contenido de fitohemaglutinina entre 8.000 y 30.000 HAU/g.
- 5 2. Procedimiento de preparación del extracto según la reivindicación 1, que comprende:
 - a) Extracción de semillas de *Phaseolus vulgaris* con tampones acuosos con un pH que oscila entre 3 y 6,5, y posterior separación del extracto de la biomasa, que puede seguir extrayéndose con el tampón si es necesario hasta que se agoten los inhibidores de la α -amilasa y las fitohemaglutininas;
 - 10 b) Filtración o centrifugación de los extractos combinados, y concentración a un volumen correspondiente a aproximadamente el 10% del peso del extracto después de la centrifugación;
 - c) Precipitación diferencial del extracto acuoso concentrado con etanol diluido, a una concentración final de alcohol de entre 60 y 70% v/v;
 - d) Separación del precipitado y la re-precipitación del agua desmineralizada con un 60% de etanol, o la diafiltración a través de una membrana con un corte de 10.000 Da, y el secado del residuo de la precipitación.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que se utilizan tampones de fosfato, citrato o acetato, tampones de aminoácidos dicarboxílicos o soluciones hidroalcohólicas tamponadas.
4. Uso de los extractos según la reivindicación 1 para la preparación de una composición útil como supresor del apetito.
5. Fórmulas farmacéuticas y dietéticas que comprenden como ingrediente activo los extractos según la reivindicación 1 en dosis que oscilan entre 50 y 1.000 mg y un adyuvante y/o portador(es) fisiológicamente aceptable(s).