



(12) PATENT

(11) 346419

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 36/48 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20082729	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.12.13 PCT/EP2006/012012
(22)	Inng.dag	2008.06.19	(85)	Videreføringsdag	2008.06.19
(24)	Løpedag	2006.12.13	(30)	Prioritet	2005.12.22, IT, MI05A2450
(41)	Alm.tilgj	2008.07.08			
(45)	Meddelt	2022.07.18			
(73)	Innehaver	Indena SpA, Viale Ortles, 12, 20139 MILANO, Italia			
(72)	Oppfinner	Ezio Bombardelli, Via Gabetta, 13, 27027 GROPELLO CAIROLI, Italia Davide Berlanda, Vial Ortles, 12, 20139 MILANO, Italia Marco Bertani, Vial Ortles, 12, 20139 MILANO, Italia Fabio Donzelli, Vial Ortles, 12, 20139 MILANO, Italia Andrea Gardi, Vial Ortles, 12, 20139 MILANO, Italia Cesare Ponzone, Viale Ortles, 12, 20139 MILANO, Italia			
(74)	Fullmektig	AWA NORWAY AS, Hoffsveien 1A, 0275 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Etanol-presipiterte Phaseolus vulgaris ekstrakter, deres anvendelse og formuleringer			
(56)	Anførte publikasjoner	IGUTI A.M. et al., Occurrence and purification of alpha amylase isoinhibitors in bean Phaseolus-vulgaris L.varieties, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, vol. 39 (12), side 2131-2136 LAJOLO F.M. et al., Purification of alpha amylase inhibitor of black bean Phaseolus vulgaris cultivar Rico-23, Ciencia E Tecnologia de Alimentos, 1984, vol. 4 (1), side 1-11 POWERS J.R. et al., Purification and some physical and Chemical Properties of red kidney bean (Phaseolus vulgaris) alpha-amylase inhibitor, Journal of Food Biochemistry, 1978, vol. 1 (3), side 217-238 TORMO M.A. et al., Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (Phaseolus vulgaris) in Wistar rats, British Journal of Nutrition, 2004, vol. 92 (5), side 785-790			
(57)	Sammendrag				

Ekstrakt som kan oppnås ved ekstraksjon fra *Phaseolus* sp. med blandinger av etanol og vann, særpreget ved et α -amylaseinhibitorinnhold på mellom 1.000 og 1.600 USP/mg (HPLC-titer mellom 6 og 14 % w/w) og et fyttohemaglutinininnhold på mellom 8.000 og 30.000 HAU/g samt en fremgangsmåte for dets fremstilling.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Foreliggende oppfinnelse angår ekstrakter oppnådd fra frøene av planter av *Phaseolus vulgaris* samt fremgangsmåter for fremstilling derav. Slike ekstrakter benyttes i matvareindustrien for å redusere absorpsjonen av glukose som stammer fra stivelser i maten og redusere appetitten.

TIDLIGERE TEKNIKK

α -amylaseinhibitorer ($\alpha A1$) er et glykoprotein inneholdt i frøene av nyrebønner (*Phaseolus vulgaris*) som inhiberer den enzymatiske aktiviteten av amylase av animalsk opprinnelse, og spesielt human amylase, på en differensiert artsavhengig måte. Inhibi-
toren, som ble rensset for første gang av Marshall og Lauda i 1974 (J. Biol. Chem., 250
(20), 8030-8037, 1975), har høstet interesse på grunn av effektene som dens pankrea-
tiske amylaseinhiberende aktivitet kan utføre på tarmabsorpsjonen av glukose (som
stammer fra enzymatisk hydrolyse av stivelse), og fremfor alt for den potensielle an-
vendelse innen matvareindustrien. Karbohydrater er en viktig kilde for kalorier og
medvirker til syntesen av fett hos individer som er predisponert for fedme eller Type II
diabetes. I naturen, innen evolusjonen av artene, var tilgjengeligheten på mat sporadisk
slik at egenskapen å akkumulere energi ut over den mengden som var nødvendig for
umiddelbar bruk, var essensiell. De adipose celler, utviklet i forskjellige deler av krop-
pen, er blant de steder hvor energi blir akkumulert slik at den er lett tilgjengelig når
kroppen trenger den. Dette fysiologiske system, dirigert av endokrine og neurone sek-
reter, tillater mennesker å overleve i lange perioder, selv ved fravær av mat. Imidlertid,
i tilfelle av overskudd på mat, avslappet livsstil og genetiske grunner assosiert med livs-
stilen hos industrialiserte land, øker systemet ukontrollert de adipose energilagre med
uheldige følger så som skjønnhetsfeil, fulgt av en overbelastning av det kardiovaskulære
system. Et av hovedproblemene er fedme, som har nådd høye nivåer i enkelte land så
som Amerikas Forente Stater. Fedme er hovedårsaken til kardiovaskulær sykdom,
hypertensjon og diabetes. Overvekt, noe som er vanlig blant både menn og kvinner,
gjør at individet spiser større og større mengder mat, og resultatet er en svekkelse av
helsen. Ettersom høye blodglukoseverdier fører til en økning i energilagring, er til-
gjengeligheten av substanser som reduserer glukoseabsorpsjon meget viktig.

Verden over har behovet for anti-fedmesubstanser ført til forskning og studium av mat-
varer som motvirker den progressive kroppsvektøkning.

A-amylaseinhibitorer har i lang tid vært identifisert i forskjellige grønnsaker og korn, og spesielle kliniske forsøk har blitt utført i de senere år med blandete resultater. Avhengig av fremstillingsprosessen benyttet for konsentrasjonen og isoleringen av disse inhibitorer, har resultatene vært motstridende ettersom mange kommersielle preparater viste seg å mangle effektiv aktivitet *in vivo*. I henhold til de første studier til Layer, Carlson og Di Mango (Gastroenterology, 88(6): 1895, 1902, 1985) er dette problem tilsynelatende grunnet den høye fortynningsgraden av inhibitoren i sterkt urene preparater; faktisk har preparater av rensset inhibitor vist seg å være aktive på α -amylase når de blir introdusert direkte i tarmlumen.

Den fragmentære prosess som er beskrevet i litteraturen for fremstilling av α -amylaseinhibitorer, involverer ekstraksjon med fosfatbuffer og insolubiliseringen av proteiner med ammoniumfosfat, og gir ikke noe selektivitet. De oppnådde ekstrakter inneholder høye konsentrasjoner av fytotamagglutininer og må bli fortynnet for å oppnå ekstrakter med et akseptabelt toksisitetsnivå. Ved siden av det biologiske aspekt innbefatter kjente fremgangsmåter enkelte trinn som gjør det vanskelig å fremstille et produkt som er både aktivt og sikkert. Problemene som oppstår under ekstraksjon med buffere av forskjellige ionestyrker og pH, er grunnet de høye konsentrasjonene av protein- og polysakkaridkontaminanter som gjør dem svært viskøse, noe som fører til problemer med lav filterbarhet og lengre prosesseringstider. Ettersom dette er vandige ekstraksjoner finnes det også en høy risiko for mikrobiell forurensning av proteinekstraktet som er vanskelig å kontrollere, spesielt i tilfelle av høyt viskøse preparater. Alle disse forhold fører til et tap av produkt og gjør det vanskelig å oppnå sluttekstrakter med lav fytotamagglutinititer og tilsvarende multikomponentstandardisering. Forskjellige fremgangsmåter har blitt brukt for å løse problemet med begrensende fytotamagglutininer innbefattende varmebehandlinger som fører til nedbrytning ikke bare av fytotamagglutininene, men også av α -amylaseinhibitorene, med det resultat at de oppnådde produkter blir knapt aktive. I praksis har produktene på markedet et meget lavt α A1-innhold. Andre produkter som er for høyt anriket i α -amylaseinhibitorer forårsaker ubehagelige problemer med flatulens når administrert i større doser.

Det er kjent flere publikasjoner som beskriver utvinning og bruk av ekstrakter av *Phaseolus vulgaris*-frø i mat for å redusere absorpsjonen av glukose som stammer fra stivelser i maten og redusere appetitten. Det kan her vises til:

- IGUTI A M ET AL: "OCCURRENCE AND PURIFICATION OF ALPHA AMYLASE ISOINHIBITORS IN BEAN PHASEOLUS-VULGARIS L. VARIETIES"

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 39, no. 12, 1991, side 2131-2136, XP002437327 ISSN: 0021-8561

LAJOLO F M ET AL: "PURIFICATION OF ALPHA AMYLASE INHIBITOR OF BLACK BEAN PHASEOLUS-VULGARIS CULTIVAR RICO-23" CIENCIA E
5 TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, vol. 4, no. 1, 1984, side 1-11, XP009085035 ISSN: 0101-2061

JOSEPH R. POWERS, JOHN R. WHITAKER: "PURIFICATION AND SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF RED KIDNEY BEAN (PHASEOLUS VULGARIS) alpha-AMYLASE INHIBITOR" JOURNAL OF FOOD
10 BIOCHEMISTRY, vol. 1, no. 3, July 1978 (1978-07), side 217-238, XP009085138

TORMO M A ET AL: "HYPOGLYCAEMIC AND ANOREXIGENIC ACTIVITIES OF AN ALPHA-AMYLASE INHIBITOR FROM WHITE KIDNEY BEANS (PHASEOLUS VULGARIS) IN WISTAR RATS" BRITISH JOURNAL OF NUTRITION, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, vol. 92, no.
15 5, November 2004 (2004-11), side 785-790, XP009076850 ISSN: 0007-1145

Disse publikasjonene benytter ekstrakter av hage- eller nyrebønner (*Phaseolus vulgaris*) som inneholder α -amylaseinhibitorer, og som er i rensset form.

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Det er en hensikt med foreliggende oppfinnelse å fremskaffe ekstrakter av *Phaseolus vulgaris*-frø som er mer effektive enn tidligere kjente ekstrakter til å redusere
20 absorpsjonen av glukose som stammer fra stivelser i maten og derved reduserer appetitten etter gjentatt administrasjon.

Dette oppnås med ekstrakter av *Phaseolus vulgaris*-frø som er særpreget ved et innhold av α -amylaseinhibitorer og fyttohemagglutinin i etablerte forhold. Tidligere kjent
25 teknikk har benyttet ekstrakter av *Phaseolus vulgaris* rensset for fyttohemagglutinin idet innhold av fyttohemagglutinin har vært ansett som uheldig.

Omfanget av oppfinnelsen fremgår av de etterfølgende patentkrav.

BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Produktene ifølge oppfinnelsen fremstilles ved ekstraksjon med et vandig eller hydro-
etanolisk medium og felles ut med passende blandinger av etanol og vann.

5 Det har overraskende blitt funnet at anvendelsen av hydroetanoliske blandinger på pas-
sende konsentrerte vandige ekstrakter av nyrebønneprodukter gir anrikede ekstrakter
med et α -amylaseinhibitorinnhold med en aktivitet på mellom 1.000 og 1.600 USP/mg
(HPLC-titer på mellom 6 og 14 % w/w) og et fytohemagglutinininnhold mellom 8.000
og 30.000 HAU/g, slik at den kan bli formulert i produkter for diettanvendelse ved til-
strekkelig lave doser til å oppnå det ønskede resultat. I tillegg til denne hovedfordel gir
10 fremgangsmåten som foreliggende oppfinnelse angår, en vesentlig reduksjon i mikro-
betallet. En annen vesentlig fordel er muligheten til å oppnå et sluttprodukt som er anri-
ket i (α A1)-inhibitor med definerte fytohemagglutininforhold.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter ekstraksjon av biomassen med buffere
med en pH i området mellom 3 og 6,5, fortrinnsvis pH 3,5-5,5 og enda mer foretrukket
15 pH 4 ved temperaturer på mellom 2 og 25 °C og fortrinnsvis mellom 4 og 18 °C og
etterfølgende separasjon av ekstraktet fra biomassen ved sentrifugering.

Passende buffere for ekstraksjonen er typisk fosfat-, sitrat- eller acetatbuffere eller
dikarboksydiske aminosyrebuffere, fortrinnsvis fosfat- eller sitratbuffer. Bufrede vann-
alkohol-blandinger kan også bli brukt som ekstraksjonsoppløsningsmiddel.

20 Avhengig av de anvendte ekstraksjonsmidler og av ekstraksjonscyklusen blir 5 til 20
volumdelar av buffer per del av medikament brukt, fortrinnsvis 10-12,5 deler, og blan-
dingen omrøres i 1-4 timer, fortrinnsvis 2 timer; idet biomassen kan bli ytterligere ekst-
rahert tre ekstra ganger med en passende mengde buffer, og i alle tilfeller inntil dens α -
amylaseinhibitor- og fytohemagglutinininnhold er oppbrukt.

25 De kombinerte ekstrakter blir klargjort med filtrering eller sentrifugering og konsentrert
i vakuum ved en temperatur på mellom 25° og 35 °C, fortrinnsvis 30 °C, eller ved ultra-
filtrering (10.000 Da utelukkelse) til et volum som tilsvarer omtrent 10 % av vekten av
ekstraktet etter sentrifugering.

30 Det konsentrerte vandige ekstrakt blir så utfelt med etanol tilsatt til en sluttkonsentra-
sjon på mellom 60 og 70 % v/v, fortrinnsvis 65 % v/v ved utførelse ved en temperatur
på mellom 18° og 30 °C, og fortrinnsvis mellom 20° og 25 °C.

Det oppnådde presipitat kan bli sentrifugert og/eller filtrert, oppløst på nytt i demineralisert vann og re-presipitert i 60 % etanol for å redusere salt delen. Alternativt kan det bli diafiltrert gjennom en membran med en 10.000 Da utesluttelse. Sedimentet fra utfellingen, som utgjør ekstraktet i henhold til oppfinnelsen, tørkes.

- 5 Dersom disse fremgangsmåter blir brukt kan et ekstrakt med de følgende særtrekk bli oppnådd:

- HPLC-titer: $\geq 6 \% \leq 14 \% \text{ w/w}$
- α -amylaseinhiberende aktivitet: $\geq 1.000 \leq 1.600 \text{ USP/m}$
- hemagglutinerende aktivitet: $\geq 8.000 \leq 30.000 \text{ HAU/g}$

- 10 Effektiviteten av ekstraktene har blitt bevist på rotter behandlet med doser på 200 og 400 mg/kg per dag med fri tilgang på mat bestående av en spesiell stivelsesanriket diett. I løpet av behandlingen reduserer ekstraktene ifølge oppfinnelsen matkonsumpsjonen vesentlig, mens vannkonsumpsjon forblir uendret.

- 15 Produktet ifølge oppfinnelsen blir perfekt tolerert og kan bli inkorporert i farmasøytiske og diettformuleringer ved doser som ligger i området mellom 50 og 1.000 mg for å bli tatt ved hovedmåltider. Ekstraktet kan bli inkorporert i drikkbare former eller liknende for å bli tatt som appetitthemmere.

Eksemplene gitt nedenfor illustrerer fremstillingen og fordelene ved oppfinnelsen.

- 20 ***EKSEMPEL 1: Fremstilling av et nyrebønneekstrakt anriket med α 1 oppnådd ved ekstraksjon med sitratbuffer og utfelling med etanol.***

En suspensjon av 150 g nyrebønnemel i 1,5 l sitronsyre 5,75 g/l ble omrørt i 3 timer ved +4 °C.

- 25 Suspensjonen ble sentrifugert og det vandige sentrifugatet ble konsentrert 7,5 ganger (tørt residuum: 15,0 % w/w). Konsentratet ble fortynnet med 95 % etanol til en konsentrasjon på 65 % etanol for å oppnå et presipitat som ble gjenvunnet med sentrifugering ved +22 °C. Det oppsamlede faststoffet ble tørket under vakuum ved en temperatur som ikke overstiger 50 °C. Det oppnådde produkt (utbytte 2,36 %) har en α -amylaseinhiberende aktivitet på 1.050 U/mg, en hemagglutinerende aktivitet på 9.000 HAU/g og en HPLC-titer på 7,3 % w/w.

EKSEMPEL 2: Fremstilling av et nyrebønneekstrakt anrikt med α 1 oppnådd ved ekstraksjon med sitratbuffer og utfelling med etanol

En suspensjon av 150 g nyrebønnemel i 1,5 l sitronsyre ble omrørt i 2 timer ved +22 °C.

5 Suspensjonen ble sentrifugert og det vandige sentrifugatet ble konsentrert 10,5 ganger (tørt residuum: 17,1 % w/w). Konsentratet ble fortynnet med 95 % etanol til en konsentrasjon på 65 % etanol for å oppnå et presipitat som ble gjenvunnet med sentrifugering ved +22 °C. Det oppsamlede faststoffet ble tørket under vakuum ved en temperatur som ikke overstiger 50 °C. Det oppnådde produkt (utbytte 3,5 %) har en α -amylaseinhiberende aktivitet på 1.600 U/mg, en hemagglutinerende aktivitet på 18.600 HAU/g og
10 en HPLC-titer på 10,0 % w/w.

EKSEMPEL 3: Fremstilling av et nyrebønneekstrakt anrikt med α 1 oppnådd ved dobbel ekstraksjon med vann-alkohol-oppløsning (30 % etanol) av sitronsyre og utfelling med etanol.

15 En suspensjon av 100 g nyrebønnemel i 1,0 l av en 70:30-blanding av vann og etanol inneholdende sitronsyre 4,6 g/l, ble omrørt i 2 timer ved +22 °C.

Suspensjonen ble sentrifugert, den klare flytende fase kastet, og sedimentet underkastet en ny ekstraksjonssyklus med 750 ml vann. Den flytende fase fra andre ekstraksjon ble slått sammen med den første og konsentrert 4,3 ganger (tørt residuum: 4,78 % w/w). Konsentratet ble fortynnet med 95 % etanol til en konsentrasjon på 70 % etanol for å
20 oppnå et presipitat som ble gjenvunnet med sentrifugering ved +22 °C. Det oppsamlede faststoffet ble tørket under vakuum ved en temperatur som ikke overstiger 50 °C. Det oppnådde produkt (utbytte 0,88 %) har en α -amylaseinhiberende aktivitet på 1.570 U/mg, en hemagglutinerende aktivitet på 27.000 HAU/g og en HPLC-titer på 13,6 % w/w.

P a t e n t k r a v

1. Ekstrakt som kan oppnås ved ekstraksjon av frø fra *Phaseolus vulgaris* med blandinger av etanol og vann,
karakterisert ved et α -amylaseinhibitor-innhold på mellom 1.000 og 1.600 USP/mg (HPLC-titer mellom 6 og 14 % w/w) og et fytohemagglutinin-innhold på mellom 8.000 og 30.000 HAU/g.
5
2. Fremgangsmåte for fremstilling av ekstraktet ifølge krav 1, hvilken omfatter
 - a) ekstraksjon av frø fra *Phaseolus vulgaris* med vandige buffere med en pH i området mellom 3 og 6,5 og etterfølgende separasjon av ekstraktet fra biomassen, som
10 kan bli videre ekstrahert med bufferen om ønsket inntil α -amylaseinhibitorene og fytohemagglutininene er utarmet;
 - b) filtrering eller sentrifugering av de kombinerte ekstrakter og konsentrasjon til et volum tilsvarende omkring 10 % av vekten av ekstraktet etter sentrifugering;
 - c) differensiell utfelling av det konsentrerte vandige ekstrakt med fortynnet etanol ved en sluttalkoholkonsentrasjon på mellom 60 og 70 % v/v;
15
 - d) separasjon av presipitatet og gjenutfelling fra demineralisert vann med 60 % etanol eller diafiltrering gjennom en membran med en 10.000 Da utesluttelse og tørking av utfellingsresiduum.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, hvor fosfat-, sitrat- eller acetatbuffere, dikarboksydiske aminosyrebuffere eller bufrede vann-alkohol-oppløsninger blir benyttet.
20
4. Anvendelse av ekstrakter ifølge krav 1 for å fremstille en sammensetning anvendelig som appetitthemmer.
5. Farmasøytisk og diettformulering omfattende, som aktiv bestanddel, ekstrakt ifølge krav 1 ved doser i området mellom 50 og 1.000 mg og fysiologisk akseptabel(e)
25 adjuvant(er) og/eller bæremiddel(er).