



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2001132333/13, 26.05.2000

(24) Дата начала действия патента: 26.05.2000

(30) Приоритет: 01.06.1999 (пп.1-8) IT MI99A001223

(43) Дата публикации заявки: 10.09.2003

(45) Опубликовано: 27.03.2005 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: GB 1380253 A, 08.01.1975. FR 2104911, 28.04.1972. ПЕРЕПЕЛИЦА Э.Д и др. Условия расщепления ферментным препаратом *Aspergillus niger* ВКМт-33 протодиосцина - основного гликозида из *Tribulus terrestris* 1. Прикладная биохимия и микробиология, т.II. вып.6, с.901-905.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 29.11.2001

(86) Заявка РСТ:
EP 00/04794 (26.05.2000)

(87) Публикация РСТ:
WO 00/73489 (07.12.2000)

Адрес для переписки:

129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры",
пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

АККУАТИ Вальтер (IT),
ПОНДЗОНЕ Чезаре (IT)

(73) Патентообладатель(ли):

ИНДЕНА С.П.А. (IT)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ RUSCUS ACULEATUS

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения производных стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus* (рускосапонинов). Способ получения десглюкоцесрамнорусцина включает гидролиз стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus*

(рускосапонинов) в результате ферментации субстрата, содержащего указанные гликозиды, с помощью гриба вида *Aspergillus niger*. Способ позволяет получить десглюкоцесрамнорусцин с высокой степенью эффективности. 6 з.п. ф-лы.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 249 043** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 P 33/00, 19/44//C 12 P 33/00, C 12 R 1:685)**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2001132333/13, 26.05.2000**

(24) Effective date for property rights: **26.05.2000**

(30) Priority: **01.06.1999 (cl.1-8) IT MI99A001223**

(43) Application published: **10.09.2003**

(45) Date of publication: **27.03.2005 Bull. 9**

(85) Commencement of national phase: **29.11.2001**

(86) PCT application:
EP 00/04794 (26.05.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/73489 (07.12.2000)

Mail address:
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):
**AKKUATI Val'ter (IT),
PONDZONE Chezare (IT)**

(73) Proprietor(s):
INDENA S.P.A. (IT)

(54) **METHOD FOR PREPARING DERIVATIVES OF STEROID GLYCOSIDES FROM RUSCUS ACULEATUS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, biochemistry, natural compounds.

SUBSTANCE: invention relates to a method for preparing derivatives of steroid glycosides from the plant *Ruscus aculeatus* (ruscosaponins). Method for preparing desglucodesrhamnoscicin involves hydrolysis of steroid glycosides from *Ruscus*

aculeatus (ruscosaponins) by fermentation of substrate containing indicated glycosides using fungus of species *Aspergillus niger*. Method provides preparing desglucodesrhamnoscicin with the high degree of effectiveness.

EFFECT: improved preparing method.
2 ex

R U 2 2 4 9 0 4 3 C 2

R U 2 2 4 9 0 4 3 C 2

Настоящее изобретение относится к способу получения производных стероидных гликозидов *Ruscus Aculeatus* (рускосапонинов).

5 Более конкретно, настоящее изобретение относится к получению десглюкодесрамнорусцина путем ферментативного гидролиза рускозида и/или десглюкорускозида.

Десглюкорамнорусцин и соответствующие свободные агликоны, рускогенин и неорускогенин, которые могут быть легко получены из десглюкодесрамнорусцина кислотным гидролизом, представляют собой ценные фармацевтически активные вещества, обладающие противовоспалительной и коннектив-защитной активностями.

10 Однако химическое получение указанных активных веществ из рускозида или десглюкорускозида достаточно проблематично, поскольку оно требует применения жестких условий, например проведения гидролиза сильными кислотами, и использования сложных технологических стадий, в результате чего получают сильно гетерогенную смесь промежуточных соединений и продуктов реакции.

15 В связи с этим очень желательно разработать способ получения десглюкодесрамнорусцина, лишенный упомянутых выше недостатков, присущих известным химическим способам. Настоящее изобретение удовлетворяет указанной потребности, обеспечивая способ получения десглюкодесрамнорусцина, заключающийся в гидролизе стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus* (рускосапонинов) путем ферментации субстрата, содержащего указанные гликозиды, с помощью грибов вида *Aspergillus niger*. Обычно в качестве питательного комплексного субстрата используют культуральный бульон. Как правило, ферментацию проводят при температуре 25-30° С, предпочтительно при 27° С, при перемешивании и барботаже воздуха, используемых для того, чтобы поддерживать величину pO_2 равным 50% или выше.

25 Обычно концентрация исходных стероидных гликозидов составляет величину в интервале 5-15% мас./об, предпочтительно, 8-10% мас./об, а pH культурального бульона составляет 4-6, предпочтительно 4,5-5,5.

Биотехнологический способ согласно настоящему изобретению позволяет осуществлять всю последовательность реакций на одной стадии ферментации, на которой микроорганизм, выбранный с использованием подходящих микробиологических методик, способен экспрессировать необходимые энзимные активности для осуществления всех последовательных трансформационных реакций, начиная с исходного сложного гетерогликозида, с получением моногликозида или конечного агликона. Фактически, указанные гидролазные трансформации включают последовательность β -гликозидазных, α -рамнозидазных реакций с участием промежуточных соединений, которые последовательно выделяются в ходе процесса. Дополнительная α -арабинозидазная реакция позволяет получать свободный агликон (рускогенин).

30 Предлагаемый подход является новым, поскольку в литературе отсутствуют примеры использования указанной методики для получения указанных продуктов.

Микроорганизмы, пригодные для осуществления необходимых трансформаций, получают селекцией на синтетических или полусинтетических средах, дополненных субстратами, подлежащими трансформации, помимо или вместо традиционных источников углерода (глюкоза, сахароза и т.п.). В данном случае рассматриваемые субстраты (рускозид, десглюкорускозид) могут добавляться в систему в достаточно высоких концентрациях, например 90-100 г/л. Агаровые среды для выделения включают такие известные для микробиологии рецептуры, как солодовый агар и агар Чапека, или аналогичные рецептуры, в которых источником азота могут служить пептоны, мочевины, нитрат аммония и т.п., тогда как традиционный источник углерода (глюкоза, сахароза) может быть заменен или дополнен рускозидом или десглюкорускозидом. Указанные среды могут быть также дополнены такими минеральными солями калия, магния, марганца, цинка и т.п., как их фосфаты, сульфаты и/или хлориды. Выделительные среды могут иметь значение pH в интервале 4-6, предпочтительно, 4,5-5,5.

Микроорганизмы, подходящие для требуемых биотрансформаций, выделяют скалярным разведением и культивированием водных суспензий образцов почвы, гумуса, растительных экстрактов и других аналогичных органических источников.

5 Подвергнутые описанной выше селекции микробные культуры выделяют в микробиологических пробирках, содержащих те же культуральные среды, и используют для биотрансформации рускозида и десглюкорускозида, добавляя в жидкую культуральную среду, содержащую такие же источники азота, что использовались в выделительной среде, например мочевины или пептон, с добавлением фосфатов и описанных выше минеральных солей при рН в интервале 4-6, предпочтительно 4,5-5,5.

10 Следуя описанным методикам, было обнаружено, что подвергнутые селекции культуры *Aspergillus niger* способны к трансформации рускозида и десглюкорускозида в десглюкодесрамнорусцин, непосредственный предшественник рускогенинов, в результате осуществления последовательности ферментативных реакций с участием β -глюкозидазы и α -рамнозидазы.

15 Последующая реакция с участием α -арабинозидазы приводит к получению сапонины в агликоновой форме (рускогенин - неорускогенин).

20 Отобранная культура способна к осуществлению указанных трансформаций, произрастая в регулируемых (термостатируемых) условиях, в оптимальном температурном интервале 25-30° С, при перемешивании на роторном шейкере (скорость вращения 200-300 об/мин). Указанную ферментацию также можно осуществлять в подходящем биореакторе при различных уровнях масштабирования с целью промышленного производства желаемых производных сапонины.

25 Микроорганизмы, используемые в указанных биотрансформациях, способны постоянно поддерживать каталитическую активность даже в повторяющихся циклах ферментации, осуществляемой периодическим или непрерывным способом.

Важными преимуществами способа настоящего изобретения является применение менее сложных стадий разделения и регенерации продукта, которые могут быть осуществлены более легким и менее дорогостоящим способом.

30 В целях длительного хранения отобранные микроорганизмы могут быть заморожены в виде суспензий, обогащенных такими криоконсервантами, как глицерин, пептон и т.п., при температуре в интервале от -80° С до -196° С (в жидком азоте), или подвергнуты сушке вымораживанием.

За ходом биоконверсии можно следить с использованием ТСХ и ВЭЖХ анализа культурального бульона, используя для этой цели следующие аналитические методы.

35 Анализ методом ТСХ

- Силикагелевые пластины 60 F250 Merck

- Элюенты:

А) Этилацетат - метанол 9:1

В) Этилацетат - метанол - вода 100:15:10

40 - Детекция: реакция с 10% серной кислотой и нагревание в течение 5 минут при 120° С с последующей детекцией в видимой или УФ-области

Анализ методом ВЭЖХ

- Колонка: Supelcosil LC18, 250× 4,6 мм, 5 мкм

45 - Элюент: ацетонитрил - вода 60:40

- Длина волны: 200 нм

- Впрыскиваемый объем: 10 мкл

- Расход газа: 1 мл/мин

50 Такие конечные продукты биотрансформации, как десглюкодесрамнорусцин, могут быть выделены экстракцией культурального бульона *n*-бутанолом, с последующими стадиями очистки, проводимыми с использованием хлорированных растворителей (например, трихлорэтана) и хроматографии на силикагеле. Наконец, продукт можно перекристаллизовывать из различных растворителей, например из изопропанола, этилацетата, хлороформа, ацетона, метанола. Помимо основного продукта могут быть

получены десглюкодесрамнорусцины, этерифицированные в положении С-2', например, с помощью 2-гидрокси-3-метилпентановой кислоты.

Сапонины в агликоновой форме (рускогенины) получают кислотным гидролизом описанных выше продуктов ферментации.

5 Следующие ниже примеры более подробно описывают настоящее изобретение.

Пример 1

Две колбы с культурной средой (солодовый бульон, 250 мл в каждой колбе) инокулировали спорами культуры *Aspergillus niger* на солодовом агаре, полученной селекцией в модифицированной агаровой солодовой среде (дополненной 2% рускозида).

10 Колбы инкубировали в течение 48 часов при +27° С на орбитальной мешалке со скоростью вращения 250 об/мин. После инкубации предкультуру переносили в биореактор, содержащий 7 л стерильного продуцирующего бульона R090, имеющего следующий состав (приведенные величины относятся к одному литру деионизированной воды): сухой экстракт рускозида (90 г), мочевины (1 г), пептон (1 г), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 г), KCl (1,5 г), KH_2PO_4 (1 г),
15 $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,2 г), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 г), пеногаситель P200 (1,5 мл), pH около 5.

Ферментацию осуществляли, основываясь на процентном количестве растворенного кислорода (pO_2), постепенно повышая скорость перемешивания и расход барботажного воздуха с достижением величины pO_2 более 50%. За ходом биопревращения следили с помощью анализа методами ВЭЖХ и ТСХ. Через 5 дней инкубации при +27° С
20 ферментацию прекращали. Анализ бульона методами ВЭЖХ и ТСХ показал, что в реакционной среде отсутствует рускозид, а главным продуктом реакции является десглюкодесрамнорусцин и следы рускогенинов.

Культуральный бульон истощали экстракцией *n*-бутанолом. Бутанольный экстракт досуха концентрировали в вакууме при +60° С, повторно растворяли в 70% метаноле и подвергали обратной экстракции трихлорэтаном. Хлорированный раствор концентрировали в вакууме до образования сухого материала. После повторного растворения в смеси хлороформ-метанол полученный продукт очищали методом колоночной хроматографии (Kieselgel, Merck), используя в качестве элюента смесь этилацетат-хлороформ в соотношении 9:1. Состав фракций контролировали методами ВЭЖХ и ТСХ. Фракцию очищенного продукта концентрировали в вакууме, после чего повторно растворяли в ацетоне и перекристаллизовывали. В результате дополнительной перекристаллизации из метанола получали 7 г продукта, идентифицированного спектроскопическим анализом как десглюкодесрамнорусцин. Кроме основного продукта, в небольшом количестве (около 800 мг) получали десглюкодесрамнорусцин, этерифицированный в положении С-2'
35 2-гидрокси-3-метилпентановой кислотой.

В результате кислотного гидролиза описанных выше продуктов ферментации получали сапонины в агликоновой форме (рускогенины).

Пример 2

Используя ферментер, описанный в примере 1, осуществляли первый цикл биотрансформации, после чего 90% культурного бульона отбирали для экстракции с целью получения конечного продукта; оставшиеся 10% ферментационного бульона добавляли в ферментер со свежей средой R090, доводя конечный объем до 7 л. Второй цикл ферментации проводили с использованием описанных выше параметров и средств аналитического контроля. Через 5 дней инкубации при +27° С ферментация завершалась.
45

Культуральные бульоны из двух циклов ферментации обрабатывали по методике примера 1 с целью экстракции и регенерации конечного продукта. По окончании финальной стадии получали 14 г десглюкодесрамнорусцина.

Формула изобретения

50 1. Способ получения десглюкодесрамнорусцина, включающий гидролиз стероидных гликозидов *Ruscus aculeatus* (рускосапонинов) в результате ферментации субстрата, содержащего указанные гликозиды, с помощью грибка вида *Aspergillus niger*.

2. Способ по п.1, в котором указанный субстрат представляет собой бульон культуры.

3. Способ по п.2, в котором указанную ферментацию проводят при температуре 25-30 °С, в условиях перемешивания и барботажа воздуха для достижения величины pO_2 , равной 50% или более.

4. Способ по п.3, в котором температура составляет 27°С.

5 5. Способ по п.3, в котором исходная концентрация указанных стероидных гликозидов имеет значение в интервале 5-15% мас./об.

6. Способ по п.5, в котором указанный интервал концентраций составляет 8-10% масс/об.

10 7. Способ по любому из пп.2-6, в котором рН культурального бульона имеет значение в интервале 4-6.

8. Способ по п.7, в котором рН культурального бульона имеет значение в интервале 4,5-5,5.

15

20

25

30

35

40

45

50