SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286062

(21) Číslo prihlášky: **1747-2001**

(22) Dátum podania prihlášky: **29. 5. 2000**

(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **5. 2. 2008**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2008**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **MI99A001222**

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **1. 6. 1999**

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **IT**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 4. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **04/2002**

(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **28. 1. 2008**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP00/04873**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/73483**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2006):

C12P 33/00

(73) Majiteľ: **INDENA S. P. A., Milano, IT;**

(72) Pôvodca: **Ponzone Cesare, Milano, IT;**
De Rosa Mario, Napoli, IT;
Morana Alessandra, Napoli, IT;
Di Lazzaro Antonella, Portici, IT;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob prípravy desglukodesramnoruscínu**

(57) Anotácia:
Spôsob prípravy desglukodesramnoruscínu, ktorý zahŕňa enzymatickú hydrolýzu steroidných glykozidov z *Ruscus aculeatus* (ruscosaponínov) prostredníctvom surových hydroláz z *Aspergillus niger*.

SK 286062 B6

Oblasť vynálezu

Predložený vynález sa týka spôsobu prípravy derivátov steroidných glykozidov z *Ruscus aculeatus* (ruscosaponínov).

Doterajší stav techniky

Desglukoramnoruscín a zodpovedajúce voľné aglykóny, ruscogenín a neuruscogeín, ktoré je možné jednoducho získať z desglukodesramnoruscínu kyslou hydrolýzou, sú hodnotné, farmaceuticky účinné látky, ktoré majú protizápalové účinky a účinky chrániace spojivá.

Ale chemická príprava uvedených účinných látok vychádzajúca z ruscozidu alebo desglukoruscozidu je problematická, keďže vyžaduje drastické podmienky, ako napríklad hydrolýzu so silnými kyselinami a komplexné operatívne kroky, ktorých výsledkom je veľmi heterogénna zmes medziproduktov a produktov.

Bolo by preto veľmi želateľné poskytnúť spôsob prípravy desglukodes-ramnoruscínu, ktorý prekonáva uvedené nevýhody spojené so známymi chemickými procesmi.

V dokumente č. DE 2202393 sa desglukodesramnoruscín získa z desglukoruscínu zohriatím kyseliny octovej.

Perepelitsa et. al. (1975) PRIKLADNAYA BIOKHIMIYA I MIKROBIOLOGIYA, 11, 901-905 hydroláza z *Aspergillus niger* sa použije na získanie dioscín a trilín a protodioscín štiepením glukózoramnozových väzieb.

Podstata vynálezu

Spôsob prípravy desglukodesramnoruscínu, ktorý zahŕňa enzymatickú hydrolýzu steroidných glykozidov z *Ruscus aculeatus* - ruscosaponínov, prostredníctvom surových hydroláz z *Aspergillus niger*.

Konkrétnejšie sa vynález týka spôsobu prípravy desglukodesramnoruscínu čiastočnou enzymatickou hydrolýzou ruscínu, desglukoruscínu alebo ruscozidu.

Enzymatická hydrolýza podľa vynálezu sa uskutočňuje prostredníctvom surových enzymatický prípravkov založených na hydrolázach extrahovaných z *Aspergillus niger*. Uvedené prípravky sú komerčne dostupné a používajú sa vo vinárskom a potravinárskom priemysle. Výhodné je najmä použitie prípravku, ktorý je komerčne dostupný od firmy Gist Brocades pod ochrannou známkou Cytolase PCL5.

Uvedené enzymatické prípravky majú v rovnakom čase β-glukopyranozidázové a α-ramnopyranozidázové aktivity a preto poskytujú sekvenčné odstraňovanie β-glukozidového zvyšku nasledované odstraňovaním α-ramnozidového zvyšku na požadovaný produkt.

Enzymatická hydrolýza sa uskutočňuje vo vodnom roztoku tlmenom na pH 5 alebo vo vode obsahujúcej do približne 30 % objemových etanolu. Pozorovalo sa, že v praxi nemá prítomnosť etanolu negatívny účinok na enzymatickú aktivitu: aktivita β-glukopyranozidázy sa zvyšuje v prítomnosti etanolu, zatiaľ čo na druhej strane sa aktivita α-ramnopyranozidázy mierne znižuje, ale iba do takej miery, ktorá nijako neovplyvňuje reakciu podľa vynálezu. Približne 30 % objemových etanolu je nevyhnutných na úplnú solubilizáciu desglukoruscínu, zatiaľ čo nižšie percento, približne 17 % objemových, je potrebné pre ruscozid. Použitie ruscozidu je preto niekedy výhodnejšie aj v tom, že nevyžaduje žiadne špecifické predošetrenie, a vďaka svojim povrchovo aktívnym vlastnostiam solubilizuje desglukoruscín, ktorý je výsledkom prvého kroku enzymatickej hydrolýzy, a ten potom môže byť účinnejšie transformovaný na α-ramnopyranozidázu.

Koncentrácia ruscosaponínu môže byť v rozsahu od približne 5 do približne 40 % hmotnosť/objem a hydrolýza sa uskutočňuje pri teplotách v rozsahu od 20 do 50 °C počas 3 až 7 dní.

Na konci procesu biokonverzie je možné konečný produkt, desglukodes-ramnoruscín, ktorý je nerozpustný v reakčnom systéme, jednoducho izolovať centrifugáciou a následným premytím s metanolom. Okrem toho sa spôsob podľa vynálezu môže uskutočňovať kontinuálne vďaka stabilite používaných enzýmov, tým že sa v stanovených časoch odstraňuje hydrolyzovaný produkt a kontinuálne sa pridáva čerstvý substrát. Výhodne sa na tento účel bude používať bioreaktor vybavený ultrafiltračnou membránou, aby sa predišlo akumulácii inhibítorov a denaturujúcich molekúl.

Nasledujúci príklad podrobnejšie ilustruje vynález.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Pred použitím sa enzymatický prípravok Cytolase PCL5 (Gist Brocades) diafiltroval oproti 0,1M citrát-fosfátovému tlmivému roztoku, pH 5, v Amicon aparatúre vybavenej XM membránou (hraničná hmotnosť 50 kDa), aby sa odstránili denaturujúce činidlá a inhibítory.

Pripravila sa inkubačná zmes pridávaním v nasledujúcom poradí: substrát (desglukoruscín alebo ruscozid), 0,1M citrát-fosfátový tlmivý roztok, pH 5, Cytolase PCL5 a pomaly, za stáleho miešania, etanol. Koncentrácia substrátu sa menila v rozsahu od 5 do 40 % (hmotnosť/objem) a koncentrácia etanolu od 0 do 30 % (hmotnosť/objem). Po reakcii nasledovala TCL na silikagélových platniach (60 F250 Merck) so zmesou etylacetátu, metanolu a vody v pomere 100 : 15 : 10 ako elučného činidla. Aktiváciou enzymatického prípravku bolo 38 jednotiek β-glukopyranozidázy a 2,3 jednotky α-ramnopyranozidázy na ml inkubačnej zmesi.

Biokonverzia sa uskutočňovala pri teplote 25 °C. Transformácia na desgluko-desramnoruscín sa ukončila po približne 72 hodinách, keď sa vychádzalo z des-glukoruscínu, a po približne 96 hodinách, keď sa vychádzalo z ruscozidu.

Inkubačná zmes sa potom centrifugovala pri 12 100 ot./min., 30 minút, pri 4 °C. Precipitát sa premyl s metanolom a znova sa centrifugoval v rovnakých podmienkach, ako bolo uvedené. Tento krok sa opakoval päťkrát a supernatanty sa spojili. Potom sa odparil metanolový roztok vo vákuu a výsledný produkt sa rozdrvil, čím sa získal jemný tmavožltý prášok obsahujúci 20 % desgluko-desramnoruscínu (HPLC test).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob prípravy desglukodesramnoruscínu, **vyznačujúci sa tým,** že zahŕňa čiastočnú enzymatickú hydrolýzu ruscínu, deslukoruscínu alebo ruscozidu (ruscosaponínov) prostredníctvom surových prípravkov založených na hydrolázach extrahovaných z *Aspergillus niger*, pričom uvedené enzymatické prípravky majú v rovnakom čase β-glukopyranozidázové a α-ramnopyranozidázové aktivity a poskytujú sekvenčné odstraňovanie β-glukozidového zvyšku nasledované odstraňovaním α-ramnozidového zvyšku.

2. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým,** že hydrolýza sa uskutočňuje vo vodnom roztoku, pri pH 5 alebo v zmesi vody a etanolu obsahujúcej do 30 % objemových etanolu.

3. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 a 2, **vyznačujúci sa tým,** že koncentrácia ruscosaponínu je v rozsahu od 5 do 40 % hmotnosť/objem.

4. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúci sa tým,** že hydrolýza sa uskutočňuje pri teplotách od 20 do 40 °C v priebehu 3 až 7 dní.

5. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúci sa tým,** že konečný produkt sa izoluje centrifugáciou a premývaním s metanolom.

Koniec dokumentu