



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326848**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12P 33/00 (2006.01)

C12P 19/44 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20015824	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.05.26 PCT/EP00/04794
(22)	Inng.dag	2001.11.29	(85)	Videreføringsdag	2001.11.29
(24)	Løpedag	2000.05.26	(30)	Prioritet	1999.06.01, IT, MI99A001223
(41)	Alm.tilgj	2001.11.29			
(45)	Meddelt	2009.03.02			
(73)	Innehaver	Indena SpA, Viale Ortles, 12, 20132 MILANO, IT			
(72)	Oppfinner	Walter Acquati, Milano, IT			
		Cesare Ponzzone, c/o Indena Spa, Viale Ortles, 12, 20132 MILANO, IT			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamno-ruscin ved hydrolyse av <i>Ruscus aculeatus</i> steroidglykosider med <i>Aspergillus niger</i>			
(56)	Anførte publikasjoner	GB 1380253 A PEREPELITSA, E. D. ET AL, "Usloviya passhepleniya fermentnim preparatom <i>Aspergillus niger</i> BKMt-33 protodiostsina-osnbnogo glikozida iz <i>Tribulus terrestris</i> L.", Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiy, vol. 11, nr. 6, 1975, s. 901-905			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin som omfatter hydrolysen av *Ruscus aculeatus* steroid glykosider (ruscosaponiner) gjennom fermentering av et substrat inneholdende nevnte glykosider ved hjelp av sopp av *Aspergillus niger* spesien.

Foreliggende oppfinnelse omhandler en fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin omfattende hydrolyse av rhamnose/arabinose heterosidiske bindinger av Ruscus aculeatus stereoglykosider via fermentering av et substrat inneholdende nevnte glykosider ved hjelp av sopp av *Aspergillus niger*-arten oppnådd ved utvelgelse på et dyrkningsmedium hvor den konvensjonelle karbonkilde har blitt byttet ut eller supplementert med ruscosid eller desglukoruscosid.

Desglukorhamnoruscin og de tilsvarende frie aglykoner, ruscogenin og neoruscogenin, som lett kan oppnås fra desglukodesrhamnoruscin ved sur hydrolyse, er verdifulle farmasøytiske aktive prinsipper som har anti-inflammatoriske og konnektivbeskyttende aktiviteter.

Den kjemiske fremstilling av nevnte aktive prinsipper som starter fra ruscosid eller desglukoruscosid er imidlertid problematisk siden det krever drastiske betingelser, slik som hydrolyse med sterke syrer, og komplekse driftstrinn, som gir en svært heterogen blanding av mellomprodukter og produkter.

Det ville derfor være svært ønskelig å tilveiebringe en fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin som overkommer ulempene nevnt over forbundet med de kjente kjemiske prosesser.

Det er tidligere kjent fra GB-A-1380253 en fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin ved hydrolyse av Ruscus aculeatus steroidglykosider ved enzymatisk spalting med takadiastase eller cellulase og det er fra en artikkel av Perepelitsa, E.D. et al., i Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiy, vol. 11, nr.6, s. 901-905, kjent å anvende enzymatisk ekstrakt fra *Aspergillus niger* for å hydrolysere steroidsaponiner fra *Tribulus terrestris*.

Foreliggende oppfinnelse tilfredsstillende slike behov, ved å tilveiebringe en fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoruscin som omfatter hydrolyse av *Ruscus aculeatus* steroidglykosider (ruscosaponiner) gjennom fermentering av et substrat inneholdende nevnte glykosider ved hjelp av sopp av *Aspergillus niger* arten som angitt ovenfor.

En dyrkningsnæringsbuljong blir typisk anvendt som et kompleks næringsmiddelsubstrat, hvor den konvensjonelle karbonkilde har blitt byttet ut eller supplementert med ruscosid eller desglukoruscosid.

Fermentering blir generelt utført ved en temperatur på 25-30°C, foretrukket 27°C, under røring og lufting for å oppnå et pO_2 høyere enn eller lik 50%.

Konsentrasjonen av de startende steroidglykosidene spenner vanligvis fra 5 til 15% w/v, foretrukket fra 8 til 10% w/v og pH til dyrkningsnæringsbuljongen spenner fra 4 til 6, foretrukket 4,5-5,5.

Den bioteknologiske prosessen ifølge foreliggende oppfinnelse tillater å utføre hele reaksjonssekvensen i ett enkelt fermenteringstrinn idet mikroorganismen, valgt med passende mikrobiologiske teknikker, er i stand til å uttrykke de nødvendige enzymatiske aktiviteter for operasjon av alle de transformasjonssekvensielle reaksjoner fra utgangskompleks heteroglykosidet til monoglykosidet eller det ferdige aglykon. Nevnte hydrolasetransformasjoner omfatter faktisk en sekvens av β -glukosidase-, α -rhamnosidasereaksjoner på mellomproduktene som blir suksessivt frigitt i løpet av prosessen. En ytterligere α -arabinosidasereaksjon muliggjør oppnåelse av det frie aglykon (ruscogenin).

Nevnte tilnærming er ganske ny, idet ingen anvendbare eksempler på nevnte fremgangsmåte for fremstillingen av nevnte produkter kan finnes i litteraturen.

Mikroorganismene som er passende for å utføre de involverte transformasjoner blir oppnådd ved valg av syntetiske eller semi-syntetiske medier tilsatt de samme substratene som skal transformeres, i tillegg til eller i stedet for de konvensjonelle karbonkilder (glukose, sakkarose, og lignende). De involverte substrater (ruscosid, desglukoruscosid) kan i dette tilfellet tilsettes i like høye konsentrasjoner, f.eks. 90-100 g/l. De agariserte isoleringsmediene omfatter de vanlige formuleringer for mikrobiologi, slik som Malt-agar og Czapek-agar, eller lignende formuleringer, hvori nitrogenkilden er representert ved peptoner, urea, ammoniumnitrat og lignende, mens den konvensjonelle karbonkilden (glukose, sakkarose) har blitt substituert eller supplementert av ruscosid eller desglukoruscosid. Nevnte medier kan videre tilsettes med mineralsalter av kalium, magnesium, mangan, sink, etc., slik som fosfater, sulfater og/eller klorider. pH til isoleringsmediene kan spenne fra 4 til 6, foretrukket fra 4,5 til 5,5.

Mikroorganismene som er passende for de krevde biotransformasjoner blir gjenvunnet ved skalar fortykning og "plating" av vandige suspensjoner av prøver av jord, humus, vegetabiliske ekstrakter og andre lignende organiske kilder.

De mikrobielle kulturene valgt som beskrevet over, blir isolert i mikrobiologiske testrør inneholdende de samme dyrkningsmediene og anvendt for biotransformasjonen av ruscosid og desglukoruscosid, tilsatt i høye konsentrasjoner (til 100 g/l) til flytende kulturmedier inneholdende de samme nitrogenkilder som anvendt i isolasjonsmediene, slik som urea eller pepton, med tilsetning av fosfater og andre mineralsalter, som beskrevet over, ved pH som spenner fra 4 til 6, foretrukket 4,5-5,5.

Ved å følge fremgangsmåtene beskrevet har det blitt funnet at valgte kulturer av *Aspergillus niger* er i stand til å omforme ruscosid og desglukoruscosid til desglukodesrhamnoruscin, et direkte forstadium til ruscogeniner, ved en se-

kvens av enzymatisk β -glukosidase- og α -rhamnosidasereaksjoner.

En etterfølgende α -arabinosidasereaksjon tilveiebringer saponinet i aglykonformen (ruscogenin-neoruscogenin).

5 Den valgte kulturen er i stand til å utføre nevnte transformasjoner, og den vokser i kontrollerte (termostatiske) betingelser, ved optimale temperaturer som spenner fra 25°C til 30°C, under røring på en roterende rister (200-300 rpm). Nevnte fermentering kan også utføres i en passende
10 bioreaktor, ved forskjellige skalanivåer, for industriell produksjon av de ønskede saponinderivater.

Mikroorganismene anvendt for nevnte biotransformasjon er i stand til å stabilt opprettholde den katalytiske aktivitet, til og med for repeterte fermenteringssyklus, i porsjons-
15 vise eller kontinuerlige prosesser.

Foreliggende fremgangsmåte tilveiebringer viktige fordeler, slik som at trinnene for separasjon og gjenvinning av produktet er mindre komplekse, og også er lette å utføre så vel som kostnadsbesparende.

20 De valgte mikroorganismer kan fryses for langtidslagring, i suspensjoner anrikt med kryokonserveringsmidler, slik som glyserol, pepton og lignende, ved temperaturer som spenner fra -80°C til -196°C (i flytende nitrogen), eller utsatt for frysetørkende behandlinger.

25 Forløpet av biotransformeringen kan overvåkes av TLC- og HPLC-analyse på dyrkningsnæringsbuljongen, ved anvendelse av de følgende analytiske metoder:

TLC-Analyse

- Silikagelplater 60 F250 Merck
- 30 - Eluenter:

- A) Etylacetat - Metanol 9:1
- B) Etylacetat - Metanol - Vann 100:15:10
- Deteksjon: Reaksjon med 10% svovelsyre og oppvarming til 120°C i 5 minutter, deretter synlig og UV-deteksjon.

5 HPLC-Analyse

- Kolonne: Supelcosil LC18, 250 x 4,6, 5 µm
- Eluent: acetonitril - vann 60:40
- Bølgelengde: 200 nm
- Injeksjonsvolum: 10µl
- 10 - Strømning: 1 ml/min

De ferdige biotransformasjonsproduktene, slik som desglukodesrhamnoruscin, kan gjenvinnes ved ekstraksjon av dyrkningsnæringsbuljongen med n-butanol, deretter rensetrinn med klorerte løsningsmidler (slik som trikloretan) og sili-
15 kagelkromatografi. Til slutt kan produktet krystalliseres fra forskjellige løsningsmidler, slik som isopropanol, etylacetat, kloroform, aceton, metanol. I tillegg til hovedproduktet kan desglukodesrhamnusciner forestret ved
20 C-2', for eksempel med 2-hydroksy-3-metylpentansyre, oppnås.

Saponinene i aglykonformen (ruscogeniner) blir oppnådd ved sur hydrolyse av fermenteringsproduktene beskrevet over.

De følgende eksempler fremlegger oppfinnelsen i større detalj.

25 Eksempel 1

2 flasker av dyrkningsmedium (malt næringsbuljong, 250 ml per flaske) blir inokulert med sporer fra en kultur av Aspergillus niger på Malt-agar, oppnådd ved valg på modifisert agar maltmedium (tilsatt 2% ruscoid). Flaskene blir
30 inkubert i 48 timer ved +27°C på en orbitalrører ved 250 rpm. Etter inkubering blir prekulturen overført til bio-

reaktoren, inneholdende omkring 7 l steril produksjonsnæringsbuljong RO90, som har den følgende sammensetning (verdier referert til én liter avionisert vann): Ruscosid tørr ekstrakt (g 90), urea (g 1), pepton (g 1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g 5),
5 KCl (g 1,5), KH_2PO_4 (g 1), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (g 0,2), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (g 0,1) antiskum P2000 (ml 1,5) ved omkring pH 5.

Fermenteringen blir utført på basis av oppløst oksygen prosentandel (pO_2) ved å progressivt øke rørehastigheten og luftstrømmen for å oppnå en pO_2 -verdi som er høyere enn
10 50%. Fremdriften av bioomformingen blir overvåket ved HPLC- og TLC-analyse. Etter 5 dagers inkubasjon ved +27°C er fermenteringen over. TLC- og HPLC-analyse av næringsbuljongen viser at ruscosid har forsvunnet mens desglukodesrhamnoruscin er tilstede som hovedprodukt, med spor av ruscogenin.

15 Dyrkningsnæringsbuljongen blir grundig ekstrahert med n-butanol. Butanolekstrakten blir konsentrert til tørrhet under vakuum ved +60°C, oppløst på nytt i 70% metanol og tilbakeekstrahert med trikloretan. Den klorerte oppløsningen blir konsentrert til et faststoff under vakuum. Etter
20 oppløsning på nytt i en kloroform-metanol-blanding, blir produktet rensert med kolonnekromatografi (Kieselgel, Merck), med etylacetat-kloroform 9:1 som eluent. Fraksjonene blir undersøkt ved TLC- eller HPLC-analyse. Den rensede produktfraksjonen blir konsentrert under vakuum, deretter
25 oppløst på nytt i aceton og krystallisert. En ytterligere krystallisasjon fra metanol gir omkring 7 g produkt identifisert ved spektroskopisk analyse som desglukodesrhamnoruscin. I tillegg til hovedproduktet blir et desglukodesrhamnoruscin forestret ved C-2' med 2-hydroksey-3-metylpentansyre oppnådd i mindre mengde (omkring 800 mg).
30

Sur hydrolyse av fermenteringsproduktene beskrevet over gir saponinene i aglykonformen (ruscogeniner).

Eksempel 2

Ved drift i en fermenter som beskrevet i Eksempel 1, blir en første biotransformasjonsyklus utført. Etter det blir 90% av dyrkningsnæringsbuljongen tatt for å ekstraheres for
5 å oppnå produktet; den gjenværende 10% fermenteringsnæringsbuljong blir tilsatt til fermenteren med fersk R090-medium til et sluttvolum på omkring 7l. Denne andre fermenteringssyklusen blir utført med de samme parametrene og analytiske kontroller som beskrevet over. Etter omkring 5
10 dagers inkubasjon ved +27°C er fermenteringen fullført.

Dyrkningsnæringsbuljongene fra de to fermenteringssyklene blir behandlet som beskrevet i eksempel 1 for ekstraksjon og gjenvinning av produktet. Ved slutten av det siste trinnet blir omkring 14 g desglukodesrhamnoruscin oppnådd.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av desglukodesrhamnoscine,
karakterisert ved at den omfatter
5 hydrolyse av rhamnose/arabinose heterosidiske bindinger av
Ruscus aculeatus steroidglykosider via fermentering av et
substrat inneholdende nevnte glykosider ved hjelp av sopp
av *Aspergillus niger*-arten oppnådd ved utvelgelse på et
dyrkningsmedium hvor den konvensjonelle karbonkilde har
10 blitt byttet ut eller supplementert med ruscosid eller
desglukoruscosid.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at nevnte substrat er
en næringsmiddelbuljong.
- 15 3. Fremgangsmåte ifølge krav 2,
karakterisert ved at nevnte fermentering
utføres ved en temperatur på 25-30°C, under røring og luft-
bobling for å nå et pO₂ høyere enn eller lik 50%.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3,
20 karakterisert ved at temperaturen er
27°C.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 3,
karakterisert ved at utgangskonsentra-
sjonen av nevnte steroidglykosider spenner fra 5 til 15%
25 w/v.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
karakterisert ved at nevnte konsentrasjon
spenner fra 8 til 10% w/v.
7. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 2-6,
30 karakterisert ved at pH til
dyrkningsnæringsbuljongen spenner fra 4 til 6.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at pH til dyrkningsnæ-
ringsbuljongen spenner fra 4,5 til 5,5.