

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-4283**
(22) Přihlášeno: **26.05.2000**
(30) Právo přednosti: **01.06.1999 IT MI99A001223**
(40) Zveřejněno: **17.04.2002**
(**Věstník č. 4/2002**)
(47) Uděleno: **04.11.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.12.2009**
(**Věstník č. 50/2009**)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2000/004794**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/073489**

(11) Číslo dokumentu:

301 224

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12P 33/00 (2006.01)
C12P 19/44 (2006.01)
C12R 1/685 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

DE 22 02 393; FR 2104911.

Perepelitsa, E.D. et al.: „Usloviya passhepleniya fermentnim preparatom *Aspergillus niger* BKMT-33 protodiostsina-osnbnogo glikozida iz *Tribulus terrestris* L.“, Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, vol. 11(6), 901-905, 1975.

(73) Majitel patentu:

INDENA S. P. A., Milano, IT

(72) Původce:

Acquati Walter, Milano, IT
Ponzone Cesare, Milano, IT

(74) Zástupce:

JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Způsob výroby desglukodesrhamnoruscinu

(57) Anotace:

Způsob výroby desglukodesrhamnoruscinu spočívá v tom, že se hydrolyzují steroidní glykosidy (ruscosaponiny) *Ruscus aculeatus* fermentací substrátu, obsahujícího tyto glykosidy působením hub z čeledi *Aspergillus niger*, získaných selekcí na živném prostředí, v němž byl běžný zdroj uhlíku nahrazen nebo doplněn ruscosidem nebo desglukoruscosidem.

CZ 301224 B6

Způsob výroby desglukodesrhamnoruscinu

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu výroby derivátů steroidních glykosidů (ruscosaponinů) *Ruscus Aculeatus*. Vynález se zvláště týká způsobu výroby desglukodesrhamnoruscinu hydrolyzou ruscosidu a/nebo desglukoruscosidu fermentačním způsobem.

10

Dosavadní stav techniky

Desglukorhamnoruscin a odpovídající volné aglykony, ruscogenin a neuroscogenin, které je možno snadno získat z desglukodesrhamnoruscinu hydrolyzou v kyselém prostředí, jsou cenné látky s farmakologickou účinností, zejména s protizánětlivými účinky a s příznivými účinky na pojivovou tkáň.

15

Chemická příprava uvedených účinných látek z výchozího ruscosidu nebo desglukoruscosidu je však problematická vzhledem k nutnosti použití poměrně drastických podmínek, jako je hydrolyza působením silných kyselin a další složitě postupy, jimiž se přesto získá velmi nesourodá směs meziproductů a produktů.

20

DE 22 02 393A popisuje extrakci a hydrolyzu saponinů *Ruscus aculeatus* působením glykosidového enzymu (celulázy nebo takadiastázy), jedním z produktů této hydrolyzy je desglukodesrhamnoruscin, zdrojem takadiastázy je *Aspergillus oryzae*.

25

V dokumentu Perpelitsa E. D. a další (*Prikladnaya Biochimiya i mikrobiologiya*, sv. 11, 1975, str. 901–905) se popisuje hydrolyza protodioscinu, hlavního glykosidu z *Tribulus terrestris*, na dioscin a trillin působením *Aspergillus niger* BKMt–33.

30

Bylo by tedy velmi žádoucí navrhnout způsob výroby desglukodesrhamnoruscinu, kterým by bylo možno překonat svrchu uvedené nevýhody, které jsou spojeny se známými chemickými postupy.

Podstata vynálezu

35

Podstatu vynálezu tvoří způsob výroby desglukodesrhamnoruscinu, který spočívá v tom, že se hydrolyzují steroidní glykosidy (ruscosaponiny) *Ruscus aculeatus* fermentací substrátu, obsahujícího tyto glykosidy působením hub z čeledi *Aspergillus niger*, získaných selekcí na živném prostředí, v němž byl běžný zdroj uhlíku nahrazen nebo doplněn ruscosidem nebo desglukoruscosidem.

40

Jako živné prostředí se v typických případech užívá živný bujon.

45

Fermentace se obvykle provádí při teplotě 25 až 30, s výhodou 27 °C za stálého míchání a provzdušňování tak, aby bylo dosaženo pO₂, vyššího nebo rovného 50 %.

50

Koncentrace výchozích steroidních glykosidů se obvykle pohybuje v rozmezí 5 až 15 g/100 ml, s výhodou v rozmezí 8 až 10 g/100 ml, pH živného roztoku se pohybuje v rozmezí 4 až 6, s výhodou 4,5 až 5,5.

55

Biotechnologický postup podle vynálezu dovoluje uskutečnit celou reakci v jediném fermentačním stupni vzhledem k tomu, že mikroorganismus, zvolený vhodnými mikrobiologickými technikami, je schopný exprese nezbytných enzymů pro provedení všech po sobě následujících transformačních reakcí od výchozího složitěho heteroglykosidu k monoglykosidu nebo k výslednému

aglykonu. Tato přeměna pomocí hydrolyz spočívá v podstatě v reakcích β -glukosidázy a α -rhamnosidázy na meziproduktech, které jsou v průběhu postupu postupně uvolňovány. Další reakce s α -arabinosidázou umožňuje získat volný aglykon ruscogenin.

- 5 Svrchu uvedený přístup je zcela nový a v dosud publikované literatuře není možno nalézt žádné příklady takového postupu.

10 Mikroorganismy, vhodné k provádění svrchu uvedené přeměny, je možno získat selekci na syntetických nebo polosyntetických živných prostředích, k nimž se přidávají substráty, k jejichž přeměně má dojít. Tyto substráty se přidávají místo běžných zdrojů uhlíku, jako jsou glukóza, sacharóza a podobně, nebo spolu s těmito běžnými zdroji. Zvolené substráty, to znamená ruscosid a desglukoruscosid je možno přidat v koncentraci 90 až 100 g/l. Agarová izolační prostředí mohou být běžná mikrobiologická prostředí, jako agar se sladkem nebo Czapkův agar nebo podobná živná prostředí, která obsahují jako zdroje dusíku peptony, močovinu, dusičnan amonný a podobně, zatímco běžné zdroje uhlíku, jako jsou glukóza a sacharóza, jsou nahrazeny nebo jsou doplněny ruscosidem nebo desglukoruscosidem. K živným prostředím je možno dále přidávat anorganické soli draslíku, hořčíku, manganu, zinku a podobně, jako fosfáty, sulfáty a/nebo chloridy. Izolační prostředí může mít pH v rozmezí 4 až 6, s výhodou 4,5 až 5,5.

- 20 Mikroorganismy, vhodné k uskutečnění požadované biologické přeměny je možno izolovat postupným ředěním a naočkováním vodných suspenzí vzorků půdy, humusu, rostlinných extraktů a dalších podobných organických zdrojů na kultivační plotny.

25 Mikrobiální kultury, podrobené selekci svrchu uvedeným způsobem se pak izolují do mikrobiologických zkumavek, které obsahují totéž živné prostředí a použijí se k biologické přeměně ruscosidu a desglukoruscosidu, tyto látky je možno přidávat v poměrně vysokých koncentracích až 100 g/l ke kapalné kultuře v živném prostředí, které obsahuje stejné zdroje dusíku jako izolační prostředí, například močovinu nebo pepton a mimo to fosfáty nebo jiné anorganické soli, tak jak bylo popsáno svrchu, živné prostředí má pH 4 až 6, s výhodou 4,5 až 5,5.

30 Svrchu popsaným způsobem bylo prokázáno, že vybrané kultury *Aspergillus niger* jsou schopné přeměnit ruscosid a desglukoruscosid na desglukodesrhamnoscin, který je přímým prekursorem ruscogeninu, přeměna se uskuteční postupnými reakcemi enzymů β -glukosidázy a α -rhamnosidázy.

35 Následnou reakcí s α -arabinosidázou je možno získat saponin v aglykonové formě (ruscogenin-neoruscogenin).

40 Vybraná kultura je schopná uskutečnit svrchu popsanou přeměnu při svém růstu za řízených podmínek při použití termostatu při optimálních teplotách v rozmezí 25 až 30 °C za stálého protřepávání na rotačním třepacím zařízení při rychlosti 200 + 300 otáček/minutu. Fermentaci je rovněž možno uskutečnit ve vhodném biologickém reaktoru v různém měřítku včetně průmyslové produkce požadovaných saponinových derivátů.

45 Mikroorganismy, použité pro tuto biologickou přeměnu, jsou schopné trvale udržovat katalytickou účinnost, a to i v případě opakovaných fermentačních cyklů, prováděných po jednotlivých vsázkách nebo kontinuálním způsobem.

50 Způsob podle vynálezu má podstatné výhody, je například méně složitý včetně izolačních stupňů pro výsledný produkt a snadno se provádí, mimo to je hospodárnější než známé postupy.

55 Vybrané mikroorganismy je možno zmrazit i pro dlouhodobé uložení v suspenzích, obohacených látkami, bránícími poškození při zmrazení, jako je glycerol, pepton a podobně, při teplotách -80 až -196 °C v kapalném dusíku, nebo je možno kultury lyofilizovat.

Průběh biologické přeměny je možno sledovat pomocí analýzy TLC a HPLC živného prostředí při použití následujících analytických postupů:

TLC analýza

- 5 – silikagelové desky 60 F250 Merck
– eluční činidla:

A) ethylacetát a methanol 9:1,
B) ethylacetát, methanol a voda 100:15:10.

- detekce reakcí s 10% kyselinou sírovou a zahřátím na 5 minut na teplotu 120 °C, pak je možno
10 detekci uskutečnit ve viditelném světle nebo v UV oblasti.

HPLC analýza

- sloupec Supelcosil LC18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
– eluční činidlo: acetonitril a voda 60:40
15 – vlnová délka: 200 nm
– vstříkovaný objem 10 µl
– rychlost průtoku 1 ml/min.

- 20 Výsledné produkty biologické přeměny, jako desglukodesrhamnoscin je možno izolovat extrakcí živného prostředí n-butanolem s následným čištěním produktů pomocí chlorovaných rozpouštědel, jako trichlorethanu a chromatografií na silikagelu. Na konec je možno produkt nechat krystalizovat z různých rozpouštědel, například z isopropanolu, ethylacetátu, chloroformu, acetonu nebo methanolu. Kromě hlavního požadovaného produktu je tímto způsobem možno
25 získat také desglukodesrhamnosciny, esterifikované v poloze C-2', například kyselinou 2-hydroxy-3-methylpentanovou.

Saponiny v aglykonové formě (ruscogeniny) je možno připravit hydrolyzou fermentačních produktů v kyselém prostředí, tak jak bylo popsáno svrchu.

- 30 Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

35

Příklad 1

- 40 2 lahve živného prostředí (bujon se sladem, 250 ml v lahvi) se naočkují sporami kultury *Aspergillus niger* na sladovém agaru, získanými selekcí na modifikovaném agarovém prostředí se sladem s přidáním 2 % ruscosidu. Lahve se inkubují 48 hodin při teplotě +27 °C na orbitálním míchacím zařízení při 250 otáčkách za minutu. Po inkubaci se předběžná kultura přenesse do biologického reaktoru, který obsahuje přibližně 7 litrů sterilního produkčního bujonu RO90 s následujícím složením, v němž jsou uvedené hodnoty vztaženy na 1 litr deionizované vody:
45 suchý extrakt ruscosidu 90 g, močovina 1 g, pepton 1 g, MgSO₄.7H₂O 5 g, KCl 1,5 g, KH₂PO₄ 1 g, MnSO₄.H₂O 0,2 g, ZnSO₄.7H₂O 0,1 g, protipěnový prostředek P2000 1,5 ml, pH přibližně 5.

- 50 Fermentace se provádí při vhodné hodnotě rozpuštěného kyslíku pO₂, přičemž se postupně zvyšuje rychlost míchání a probublávání vzduchu tak, aby bylo dosaženo hodnoty pO₂ vyšší než 50 %. Postup biologické přeměny se sleduje analýzou HPLC a TLC. Po inkubaci 5 dnů při teplotě +27 °C je fermentace ukončena. Analýza TLC a HPLC živného bujonu prokazuje, že došlo k vymizení ruscosidu, zatímco jako hlavní produkt je přítomen desglukodesrhamnoscin a stopy ruscogeninů.

Živné prostředí se důkladně extrahuje n-butanolem. Butanolvý extrakt se odpaří ve vakuu při teplotě +60 °C, načež se znovu rozpustí v 70% methanolu a zpětně se extrahuje trichlorethanem. Chlorovaný roztok se odpaří ve vakuu na pevný odparek. Po opětovném rozpuštění odparku ve směsi chloroformu a methanolu se produkt čistí chromatografií na sloupci silikagelu (Kieselgel, Merck), při použití směsi ethylacetátu a chloroformu 9:1 jako elučního činidla. Frakce se ověří analýzou TLC a HPLC. Frakce s obsahem čistěného produktu se koncentrují ve vakuu a odparek se znovu rozpustí v acetonu a nechá se krystalizovat. Další krystalizací z methanolu se získá přibližně 7 g výsledného produktu, který se identifikuje spektroskopickou analýzou jako desglukodesrhamnorusin. Kromě tohoto hlavního produktu obsahuje směs ještě desglukodesrhamnoruscin, esterifikovaný v poloze C-2' kyselinou 2-hydroxy-3-methylpentanovou, tento ester se získá v nižším množství přibližně 800 mg.

Hydrolyzou svrchu popsaných fermentačních produktů v kyselém prostředí, se získají saponiny v aglykonové formě (ruscogeniny).

Příklad 2

Ve fermentoru, popsaném v příkladu 1 se provede první biotransformační cyklus, po němž se 90 % živného prostředí extrahuje k izolaci výsledného produktu. Zbývajících 10 % fermentačního prostředí se vloží do fermentoru s čerstvým prostředím RO90 do konečného objemu 7 litrů. Tento druhý fermentační cyklus se provádí za týchž podmínek a s analytickými kontrolami tak, jak bylo popsáno svrchu. Po inkubaci 5 dnů při teplotě +27 °C je fermentace ukončena.

Živné prostředí z obou fermentačních cyklů se zpracuje způsobem, uvedeným v příkladu 1 pro extrakci a izolaci výsledného produktu. Po ukončení celého postupu se získá přibližně 14 g desglukodesrhamnoruscinu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby desglukodesrhamnoruscinu, **vyznačující se tím**, že se hydrolyzují steroidní glykosidy (ruscosaponiny) *Ruscus aculeatus* fermentací substrátu, obsahujícího tyto glykosidy působením hub z čeledi *Aspergillus niger*, získaných selekcí na živném prostředí, v němž byl běžný zdroj uhlíku nahrazen nebo doplněn ruscosidem nebo desglukoruscosidem.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se jako substrát užije kapalné živné prostředí.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že se fermentace provádí při teplotě 25 až 30 °C za míchání a probublávání vzduchem až do dosažení hodnoty pO₂ vyšší nebo rovné 50 %.

4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se postup provádí při teplotě 27 °C.

5. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se výchozí koncentrace steroidních glykosidů pohybuje v rozmezí 5 až 15 g/100 ml.

6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se výchozí koncentrace steroidních glykosidů pohybuje v rozmezí 8 až 10 g/100 ml.

7. Způsob podle některého z nároků 2 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se pH živného prostředí pohybuje v rozmezí 4 až 6.

5 8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se pH živného prostředí pohybuje v rozmezí 4,5 až 5,5.

10

Konec dokumentu
