



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00746**

(22) Data de depozit: **06/10/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2019** BOPI nr. **9/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/10/2015 BOPI nr. **10/2015**

(73) Titular:
• **PHARMACORP INNOVATION S.R.L.**,
SPLAIUL UNIRII NR. 313, ET. 2, CAM.6,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **BĂRBULESCU IULIANA-DIANA**,
ALEEA MACULUI NR. 1, BL.FA22, SC.A,
ET. 2, AP. 5, SLATINA, OT, RO;

• **MARINESCU SIMONA-IOANA**,
ȘOS. IANÇULUI NR. 68, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **PRUNDIANU MIHAI**, *PIAȚA ALBA IULIA*
NR.5, BL.14, SC.1, ET.11, AP.55,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 123279 B1; RO 125079 B1

(54) **BIOSINTEZA UNOR COMPUȘI ANTIDIABETICI PE BAZĂ
DE BIOMASE DE DROJDII MINERALO-VITAMINO-PROTEICE**



RO 130613 B1

1 Invenția se referă la obținerea de biomasă de drojdie uscată de vanadiu și drojdie
îmbogățită în crom și vanadiu, drept compuși antidiabetici.

3 În prezent, este cunoscut faptul că vanadatul funcționează ca un catalizator redox și
are acțiune insulin like (Shechlter et al 1981).

5 **RU 2458701 (C1)** prezintă un nou compus care previne și tratează diabeticii
dependenți de insulină. Compusul conține extract uscat de goat's-rue, *Garsinia*, semințe de
7 in, lăstari tineri de afin, coajă fasole, *Gymnema Sylvestre*, rizomi de iarbă de grâu, microele-
mente precum crom picolinat, oxid de magneziu și sulfat de vanadiu.

9 Combi-națiunile dintre amine și compuși ai vanadiului (IV) și (V) sunt utilizate pentru
tratamentul diabetului de tip II, deoarece mimează acțiunea insulinei. Sărurile de vanadiu (IV)
11 și (V) utilizate sunt săruri vanadil, complexe de vanadil și vanadați (ortovanadat)
(**WO 02/38152 A1**).

13 În prezent, este cunoscut studiul privind selecția unor tulpini de drojzii pentru îmbog-
gățirea drojdiei cu vanadiu la următorii parametrii de cultivare: 48 h, 28°C, 10% inocul, 50 ml
15 mediu de cultură, 40 µg/ml V în 500 µl ("**Screening for a vanadium - enriched yeast and
primary optimization of cultivation condition**", **Zhany Chan, Li Chun, Fan Mei**).

17 Preparatul pe bază de crom și vanadiu prezentat în **US 2007161540** a fost folosit în
tratamentul diabetului și altor tulburări ale metabolismului glucidic. Compoziția preparatului
19 include agenți antidiabetici și una sau mai multe surse de crom și vanadiu.

21 În prezent, a fost, de asemenea, descoperit faptul că vanadatul, în prezența peroxi-
dului de hidrogen, poate fi în mod excedentar un potențator în creșterea fosforilării protein
23 tirozinazei la receptorii celulelor insulinice.

25 Studii recente au demonstrat că un număr mare de complecși cu vanadiu (IV) pot să
scadă nivelul ridicat de glucoză la animalele cu diabet. Posibilitatea că acești compuși pe
27 bază de vanadiu în starea de oxidare +5 ar putea fi activi a demonstrat că $NH_4[VO_2]dipic$ are
eficiență în micșorarea nivelului de glucoză la pisicile diabetice. În colaborare cu grupul
29 Wilsky, grupul Crans a studiat eficiența compușilor cu vanadiu în expresia genelor. În studiile
realizate, 40% din diabeticii care au luat tratament pe cale orală cu vanadil sulfat au indus
31 schimbări în expresia genelor. În plus, un număr semnificativ de gene au fost, de asemenea,
implicate în prevenirea stresului oxidativ și în semnalul căilor de traducere relatat de diabet,
și au fost identificate prin expresia genelor corectate ca rezultat la tratamentul cu compuși
vanidici.

33 Este cunoscut faptul că stresul oxidativ este de asemenea implicat ca factor care con-
tribuie la dezvoltarea diabetului și la complicațiile asociate acestuia.

35 Câteva din consecințe sunt mediul oxidativ care determină rezistență insulinică,
distrugerea celulelor beta pancreatice, toleranță la glucoză, distrugerea funcției mito-
37 condriale, care este asociată cu sensibilitatea la insulină și creșterea nivelului ROS (**Justin
L. Rains and Sushil K. Jain, "Oxidative stress, Insulin signaling and diabetes", Free
39 Radic Biol Med. 2011 March 1; 50(5): 567-575.doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006**).

41 Stresul oxidativ determină apariția diabetului zaharat. Posibilele surse ale stresului
oxidativ din DZ (diabet zaharat) includ creșterea producției de specii de radicali de oxigen,
43 în special din procesele de glicare sau lipoxidare, și scăderea sistemului de apărare antioxi-
dare enzimatic sau non-enzimatic. Cercetătorii au arătat că stresul oxidativ are influență
asupra hidratării celulelor.

45 Reducerea glicemiei la diabeticii care au primit suplimente cu crom a determinat un
nivel mai scăzut al stresului oxidativ. Cromul activează enzima insulin receptor-kinază care
47 intensifică activitatea insulinei prin fosforilarea insulin receptorilor. Se consideră că determi-
narea cromului urinar la supraîncărcarea cu glucoză este un indicator al nivelului cromului

RO 130613 B1

în organism. Biodisponibilitatea crescută a complexilor cromului cu liganzi organici cu masă mică (LMW) (X.Yang,2006) și identificarea formei biologic active a cromului sub forma unui complex cu o oligopeptidă (J. B. Vincent, 2001) a deschis calea proiectării și evaluării complexilor de crom cu liganzi organici LMW ca agenți terapeutici cu activitate hipoglicemiantă pentru a contracara efectul diminuat al insulinei în diabetul de tip II. Forma activă din punct de vedere biologic a cromului este ionul trivalent Cr^{3+} .

Conform celor mai recente date furnizate de Organizația Mondială a Sănătății - OMS (www.who.int), diabetul este una dintre cauzele majore a deceselor în lume, alături de bolile cardiovasculare și cancer. În ianuarie 2011, în lume există 250 de milioane persoane care suferă de diabet. Se estimează că până în anul 2025, numărul persoanelor care sunt afectate de diabet ar putea ajunge la 380 de milioane. În prezent, circa 250 de milioane de oameni suferă de această afecțiune în toată lumea, dintre care 55,2 milioane în Europa. Circa 1,3 milioane de români suferă de diabet zaharat, din care peste 3000 sunt copii. În România, una din 20 de persoane suferă de diabet, fiecare al șaptelea român prezentând riscul de a se îmbolnăvi de diabet, anunță Asociația Diabeticilor din România. În București, există aproximativ 200000 de bolnavi cu diabet. Se estimează că procentul bolnavilor de diabet va crește în anii următori la 6,2% din populația țării, în special datorită creșterii incidenței acestei afecțiuni în rândul tinerilor.

În prezent, se cunosc procedee de obținere de biomasă de drojdie cromiată, drojdie îmbogățită în crom și seleniu care utilizează o tulpină de drojdie *Saccharomyces cereviae* adaptată la concentrații ridicate de crom (**Bărbulescu D. și alții RO 123279 B1**).

Este cunoscut procedeul de obținere de biomasă de drojdie îmbogățită în crom și seleniu (**RO 125079 B1**).

Biomasa de drojdii îmbogățită cu vanadiu și biomasa de drojdii îmbogățită în vanadiu și crom, conform invenției, elimină dezavantajul utilizării produselor de sinteză antidiabetică cu produse obținute prin biosinteza farmaceutică.

Cercetările efectuate până acum au arătat că mineralele anorganice nu reprezintă modalitatea cea mai potrivită de administrare, pe de o parte datorită efectului lor poluant și, pe de altă parte, eficienței lor scăzute comparativ cu formele organice ale acestor elemente (crom organic). Diferențele majore dintre formele organice și cele anorganice în ceea ce privește activitatea metabolică, precum și modul de interacțiune cu alte elemente și enzime, au determinat o serie de cercetări în vederea prevenirii bolilor asociate, precum diabetul.

Mecanismul de acțiune al cromului în metabolizarea corectă a carbohidraților și lipidelor nu a fost pe deplin elucidat, structura "factorului de toleranță la glucoză" nefiind încă cunoscută cu certitudine.

Problema tehnică pe care o rezolvă problema constă în cultivarea de drojdie de vin *S. cerevisiae* ATCC 4098, printr-un nou procedeu simplu fermentativ pentru obținerea de biomasă de drojdie de crom, și drojdie cu crom și vanadiu, drept compuși antidiabetici.

Procedeul de obținere conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este constituit din următoarele faze:

a) obținerea preinoculului de laborator utilizând cultura pură de *S.cerevisiae* ATCC4098;

b) obținerea inoculului de laborator;

c) fermentația propriu-zisă a mediului de cultură însămânțat cu inoculul de laborator în raport de 10%, ce utilizează ca adaos în mediul de fermentație sursa anorganică de vanadiu, soluție de ortovanadat de sodiu 3% și sursa anorganică de crom, clorura cromică;

d) obținerea compușilor antidiabetici pe bază de drojdie îmbogățită în vanadiu și biomasa îmbogățită în crom și vanadiu, prin separarea, purificarea și uscarea mediului fermentat;

e) determinarea conținutului de vanadiu și crom total din biomasele uscate.

RO 130613 B1

- 1 Prin aplicarea procedurii pentru realizarea compușilor se obțin câteva avantaje:
- conținut ridicat de proteine;
3 - asimilarea de crom și vanadiu în biomasă;
- asimilarea unui conținut ridicat de vanadiu în biomasă;
5 - poate fi combinată cu drojdia seleniată deoarece are efect protector, antioxidant;
- obținerea unor biomase de drojdii mineralo-vitamino-proteice printr-un procedeu

7 fermentativ simplu;

- biomasele obținute din fermentația 1 ar putea fi utilizate drept substrat, ca sursă
9 organică de crom și vanadiu, și proteine și vitamine pentru o nouă fermentație;
- obținerea unei biomase îmbogățite cu crom și vanadiu, vitamine și proteine;
11 - obținerea unui conținut crescut de biomasă uscată;
- posibilitatea de a obține un nou compus prin amestecul biomasei cu vanadiu cu o
13 biomasă îmbogățită în seleniu care poate prezenta acțiune antioxidantă protectoare și anti-
diabetică.

15 Se prezintă, în continuare, 2 exemple de obținere de biomasă de drojdie îmbogățită
în vanadiu, și drojdie cu vanadiu și crom.

17 Preinoculul (cultura statică) se prepară din cultura de întreținere a unei colonii de *S.*
cerevisiae ATCC 4098, prin cultivarea pe mediu YM agar (extract de drojdie - extract de
19 malț) la temperatura de 30°C, timp de 48 h.

Mediul YM (yeast extract - malt extract) - agar (g/l)

- 21 - extract de drojdie 3,0;
- extract de malț 20,0;
23 - agar-agar 20,0;
- apă distilată 1000 ml.

25 *Prepararea inoculului de laborator*

Preinoculul este apoi utilizat la prepararea inoculului lichid astfel: se raclează cultura
27 dintr-un tub/2 tuburi înclinate, care este folosită la obținerea inoculului, care se incubează
apoi la temperatura de 30°C timp de 17...21 h cu agitare (240 rot/min) (inoculul YMSP), pe
29 bază de extract de drojdie și extract de malț, zaharoza și peptona.

Inoculul astfel obținut este folosit în raport de 10% pentru mediile de fermentație
31 prezentate în exemplele de mai jos:

Soluții preparate:

- 33 - soluție vitamine pe baza de inozitol, biotină;
- soluție de clorură cromică 5%;
35 - soluție de ortovanadat de sodiu 3%;
- soluție zaharoză 40%.

37 **Exemplul 1 - Cultivare 1 - Fermentația 1**

Mediu fermentație:

- 39 - sucroză 8 g s.r%;
- NH₄H₂PO₄ 0,1 g%;
41 - KCl 0,05 g%;
- MgSO₄ 0,05 g%;
43 - peptona 0,1 g%;
- extract de drojdie 0,3 g%;
45 - pH 6,4;
- sterilizare 110° - 20 min.

47 Repartizare 150 ml mediu/balon Erlenmayer.

RO 130613 B1

Adaosuri realizate:	1
- la 0 h de cultivare - adaos 1 ml vitamine + 0,15 ml soluție ortovanadat de sodiu/balon Erlenmayer;	3
- la 1 h de cultivare - adaos 0,15 soluție clorură cromică/balon Erlenmayer. Mediul fermentat a fost apoi centrifugat și spălat cu apă distilată și soluție tampon EDTA;	5
- s-a obținut o cremă de drojdie care a fost supusă uscării și apoi a fost inactivată prin pasteurizare;	7
- după prelucrare, s-a obținut (DCW) - biomasa uscată 0,5...0,7 g%;	
- s-a realizat determinarea vanadiului și a cromului din biomasa uscată;	9
- determinarea concentrației de crom total: 105,51 mg/kg;	
- determinarea concentrației de vanadiu total: 54,10 mg/kg.	11
Exemplul 2 - Cultivare 2	
Mediu fermentație:	13
- sucroză 8 g s.r%;	
- NH ₄ H ₂ PO ₄ 0,1 g%;	15
- KCl 0,05 g%;	
- MgSO ₄ 0,05 g%;	17
- peptone 0,1 g%;	
- extract de drojdie 0,3 g%;	19
- pH 6,4;	
- sterilizare 110° - 20 min.	21
Repartizare 150 ml mediu/balon Erlenmayer:	
- la 16 h de cultivare s-a realizat un adaos de 0,3 ml soluție de ortovanadat de sodiu/flacon;	23
- la 17 h de cultivare se adaugă 1 ml soluție zaharoză/balon Erlenmayer +2,5 ml inocul lichid/balon Erlenmayer +0,3 ml soluție ortovanadat de sodiu/balon Erlenmayer;	25
- mediul fermentat a fost apoi centrifugat și spălat cu apă distilată și soluție tampon EDTA;	27
- s-a obținut o cremă de drojdie care a fost supusă uscării și apoi a fost inactivată prin pasteurizare;	29
- s-a determinat concentrația de vanadiu total din biomasa uscată: 2670,66 mg/kg.	31

RO 130613 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere de biomasă de drojdii îmbogățită în vanadiu și biomasă de drojdii îmbogățită în crom și vanadiu din culturi de drojdii, **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele faze:

5

7

a) obținerea preinoculului de laborator utilizând cultura pură de *S.cerevisiae* ATCC4098;

9

b) obținerea inoculului de laborator;
c) fermentația propriu-zisă a mediului de cultură însămânțat cu inoculul de laborator în raport de 10%, ce utilizează ca adaos în mediu de fermentație sursa anorganică de vanadiu, soluție de ortovanadat de sodiu 3% și sursa anorganică de crom clorura cromică;

11

13

d) obținerea compușilor antidiabetici pe bază de drojdie îmbogățită în vanadiu și biomasă îmbogățită în crom și vanadiu, prin separarea, purificarea și uscarea mediului fermentat;
e) determinarea conținutului de vanadiu și crom total din biomasele uscate.

15

2. Compuși antidiabetici mineralo-vitamino-proteici, **caracterizați prin aceea că** pot fi obținuți prin procedeul descris conform revendicării 1.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 397/2019