



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00746

(22) Data de depozit: 06.10.2014

(41) Data publicării cererii:
30.10.2015 BOPI nr. 10/2015

(71) Solicitant:
• PHARMACORP INNOVATION S.R.L.,
STR. 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, S
ECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

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

(57) Rezumat:

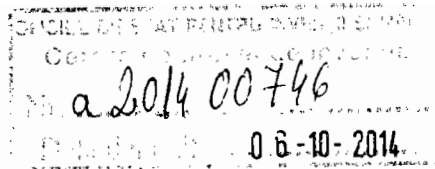
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor compuși antidiabetici pe bază de biomase de drojdii. Procedeu conform invenției constă în prepararea unei culturi de întreținere dintr-o cultură pură de *S. cerevisiae* ATCC4098, după care urmează prepararea unei culturi inocul, realizarea fermentației mediului

de cultură cu 10% inocul cu adaos de ortovanadat de sodiu 3% și clorură cromică, separare, purificare și uscarea mediului fermentat, din care rezultă biomasă uscată, având conținut de crom și vanadiu.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





BIOSINTEZA UNOR COMPUSI ANTIDIABETICI PE BAZA DE BIOMASE DE DROJDII MINERALO-VITAMINO-PROTEICE

Inventia se refera la obtinerea de biomasa de drojdie uscata de vanadiu si drojdie imbogatita in crom si vanadiu, drept compusi antidiabetici.

In prezent este cunoscut faptul ca vanadatul functioneaza ca un catalizator redox si are actiune insulin like. (Shechlter et al 1981). RU2458701 (C1) prezinta un nou compus care previne si trateaza diabeticii dependenti de insulina. Compusul contine extract uscat de goat's-rue, Garsinia, seminte de in, lăstari tineri de afin, coajă fasole, Gymnema Sylvestre, rizomi de iarbă de grâu, microelemente precum crom picolinat, oxid de magneziu si sulfat de vanadiu.

Combinatiile dintre amine si compusi ai vanadiului (IV) si (V) sunt utilizate pentru tratamentul diabetului de tip II, deoarece mimeaza actiunea insulinei. Sarurile de vanadium (IV) si (V) utilizate sunt saruri vanadil, complexe de vanadil si vanadati (ortovanadat) (WO 02/38152 A1).

In prezent este cunoscut studiul privind selectia unor tulpini de drojdii pentru imbogatirea drojdiei cu vanadiu la urmatoorii parametrii de cultivare: 48h, 28°C, 10 % inocul, 50 ml mediu de cultura, 40 µg/ml V in 500 µl. ("Screening for a vanadium – enriched yeast and primary optimization of cultivation condition. Zhany Chan, Li Chun, Fan Mei).

Preparatul pe baza de crom si vanadiu prezentat in US 2007161540 a fost folosit in tratamentul diabetului si altor tulburari ale metabolismului glucidic. Compozitia preparatului include agenti antidiabetici si una sau mai multe surse de crom si vanadiu. In prezent a fost deasemenea descoperit faptul ca vanadatul in prezenta peroxidului de hydrogen, a fost gasit ca poate fi in mod excedentar un potentator in cresterea fosforilarii protein tirozinazei la receptorii celulelor insulinice.

Studii recente au demonstrat ca, un numar mare de complecsi cu vanadiu (IV) pot sa scada nivelul ridicat de glucoza la animalele cu diabet. Posibilitatea ca, compusii pe baza de vanadiu in starea de oxidare +5 ar putea fi activi, au demonstrat ca $NH_4[VO_2]^{dipic}$ au eficienta in micsorarea nivelului de glucoza la pisicile diabetice. In

colaborare cu grupul Wilsky, grupul Crans a studiat eficienta compusilor cu vanadiu in expresia genelor. In studiile realizate 40% din diabetici au indus schimbari in expresia genelor care au luat tratament pe cale orala cu vanadil sulfat. In aditie un numar semnificativ de gene au fost deasemenea implicate in prevenirea stresului oxidativ si in semnalul cailor de traducere relatat de diabet si au fost indentificate prin expresia genelor corectate ca si rezultat la tratamentul cu compusi vanidici.

Este cunoscut faptul ca stresul oxidativ este deasemenea implicat ca si factor care contribuie impreuna la dezvoltarea diabetului si la complicatiile asociate acestuia.

Cateva din consecinte sunt mediul oxidativ care determina rezistenta insulinica, distrugerea celulelor beta pancreatice, toleranta la glucoza, distrugerea functiei mitocondriale, care este asociata cu sensibilitatea la insulina si cresterea nivelului ROS (Justin L. Rains and Sushil K. Jain, Oxidative stress, Insulin signaling and diabetes. Free Radic Biol Med. 2011 March 1; 50(5): 567-575 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006).

Stresul oxidativ determina aparitia diabetului zaharat. Posibilele surse ale stresului oxidativ din DZ (diabet zaharat) includ creșterea producției de specii de radicali de oxigen, în special din procesele de glicare sau lipoxidare și scăderea sistemului de apărare anti-oxidare enzimatic sau non - enzimatic. Cercetatorii au aratat ca stresul oxidativ are influenta asupra hidratarii celulelor.

Reducerea glicemiei la diabeticii care au primit suplimente cu crom, a determinat un nivel mai scazut al stresului oxidativ. Cromul activează enzima insulin receptor-kinaza care intensifică activitatea insulinei prin fosforilarea insulin receptorilor. Se consideră că determinarea cromului urinar la supraîncărcarea cu glucoză este un indicator al nivelului cromului în organism. Biodisponibilitatea crescută a complexilor cromului cu liganzi organici cu masă mică (LMW) (X.Yang,2006) si identificarea formei biologic active a cromului sub forma unui complex cu o oligopeptidă (J.B. Vincent, 2001) a deschis calea proiectării si evaluării complexilor de crom cu liganzi organici LMW ca agenti 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 exista 250 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 3.000 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 200.000 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 biomasa de drojdie cromiată, drojdie îmbogățită în crom și seleniu care utilizează o tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* adaptată la concentrații ridicate de crom (Barbulescu D și alții RO 123279B1). Este cunoscut procedeul de obținere de biomasa de drojdie îmbogățită în crom și seleniu (RO125079 B1).

Biomasa de drojdie îmbogățită cu vanadiu și biomasa de drojdie 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 tehnica pe care o rezolva problema consta in cultivarea de drojdie de vin *S.cerevisiae* ATCC 4098, printr-un nou procedeu simplu fermentativ pentru obtinerea de biomasa de drojdie de crom si drojdie cu crom si vanadiu, ca si compusi antidiabetici

Procedeul de obtinere consta in parcurgerea urmatoarelor etape:

Fermentatie simpla

- Prepararea unei culturi de intretinere dintr-o cultura pura de *S.cerevisiae* ATCC4098
 - Prepararea unei culturi inocul pronind de la cultura de intretinere
 - Realizarea Fermentatiei –fermentatie simpla– utilizand forme anorganice de crom si sau vanadiu
- Obtinerea compusilor pe baza de biomasa de drojdie cromianta si vanadiata care pot prezenta actiune antidiabetica

Prin aplicarea procedeuului pentru realizarea compusilor se obtin cateva avantaje:

- Continut ridicat de proteine
- Asimilarea de crom si vanadiu in biomasa
- Asimilarea unui continut ridicat de vanadiu in biomasa
- Poate fi combinata cu drojdia seleniata deoarece are efect protector, antioxidant

Se prezinta mai jos cateva exemple de obtinere de biomasa de drojdie imbogatita in vanadiu si drojdie cu vanadiu si crom.

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 malt) la temperatura de 30°C timp de 48 ore.

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

❖ extract de drojdie	3,0
❖ extract de malt	20,0
❖ agar – agar	20,0
❖ apă distilată	1000 ml

- Prepararea inoculului de laborator:

Preinoculul este apoi utilizat la prepararea inoculului lichid astfel: se racleaza cultura 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 ore cu agitare (240rpm) (inoculul YMSP), pe baza de extract de drojdie si extract de malt, zaharoza si peptona.

Inocul astfel obtinut este folosit in raport de 10% pentru mediile de fermentatie prezentate in exemplele de mai jos:

Solutii preparate:

- ❖ Solutie vitamine pe baza de inozitol, biotina
- ❖ Solutie de clorura cromica 5%
- ❖ Solutie de ortovanadat de sodiu 3%
- ❖ Solutie zaharoza 40%

Cultivare 1 – Exemplu 1 - Fermentatia 1

Mediu fermentatie

1. Sucroza8 g s.r %
2. NH₄H₂PO₄.....0.1 g%
3. KCl0.05 g %
4. MgSO₄ 0.0.5 g%
5. Peptona.....0.1 g%
6. Extract de drojdie 0,3 g%
- pH 6.4
- Sterilizare110⁰ – 20

Repartizare 150 ml mediu/ balon Erlenmayer

Adaosuri realizate:

La 0h de cultivare"-adaos 1 ml vitamine + 0.15 ml solutie ortovanadat de sodiu/ balon Erlenmayer

La 1 h de cultivare –adaos 0.15 solutie clorura cromica/ balon Erlenmayer

Mediul fermentat a fost apoi centrifugat si spalat cu apa distilata si solutie tampon EDTA.

-S-a obtinut o crema de drojdie care a fost supusa uscarii si apoi a fost inactivata prin pasteurizare.

Dupa prelucrare s-a obtinut (DCW) – biomasa uscata 0.5-0.7 g%

S-a realizat determinarea vanadiului si a cromului din biomasa uscata.

Determinarea concentratiei de Crom total: 105.51 mg/kg

Determinarea concentratiei de Vanadiu total: 54.10 mg/kg

Cultivare 2 – Exemplu 2

Mediu fermentatie

1. Sucreza	8 g s.r %
2. NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1 g%
3. KCl	0.05 g %
4. MgSO ₄	0.05 g%
5. Peptone.....	0.1 g%
6. Extract de drojdie	0,3 g%
pH	6.4
Sterilizare	110 ⁰ – 20'

Repartizare 150 ml mediu/ balon Erlenmayer

La 16 h de cultivare –s-a realizat un adaos de 0.3 ml solutie de ortovanadat de sodiu/flacon

La 17 h de cultivare –se adauga 1 ml solutie zaharoza/balon Erlenmayer

+ 2,5 ml inocul lichid/ balon Erlenmayer + 0.3 ml solutie ortovanadat de sodiu/ balon Erlenmayer

- Mediul fermentat a fost apoi centrifugat si spalat cu apa distilata si solutie tampon EDTA.

- S-a obtinut o crema de drojdie care a fost supusa uscarii si apoi a fost inactivata prin pasteurizare.

S-a determinat concentratia de Vanadiu total din biomasa uscata: 2670.66 mg/kg

Prin aplicarea procedeeului se obtin urmatoarele avantaje:

- Obtinerea unor biomase de drojdii mineralo-vitamino-proteice printr-un

procedeu fermentativ simplu

- ✓ Biomasele obtinute din fermentatia 1 ar putea fi utilizate drept substrat, ca si surse organice de crom si vanadiu si proteine si vitamine pentru o noua fermentatie
- ✓ Obtinerea unei biomase imbogatite cu crom si vanadiu, vitamine si proteine
- ✓ Obtinerea unui continut crescut de biomasa uscata
- ✓ Posibilitatea de a obtine un nou compus prin amestecul biomasei cu vanadiu cu o biomasa imbogatita in seleniu care poate prezenta actiune antioxidanta protectoare si antidiabetica

BIOSINTEZA UNOR COMPUSI ANTIDIABETICI PE BAZA DE BIOMASE DE DROJDII MINERALO-VITAMINO-PROTEICE

REVEDICARI

1. Procedeu de obtinere de biomasa de drojdii imbogatita in vanadiu si biomasa de drojdii imbogatita in crom si vanadiu din culturi de drojdii **caracterizat prin aceea ca** este constituit din urmatoarele faze:

a) Obtinerea preinoculului de laborator utilizand cultura pura de *S. cerevisiae* ATCC4098

b) Obtinerea inoculului de laborator

c) Fermentatia propriu-zisa a mediului de cultura insamantat cu inoculul de laborator in raport de 10 %, ce utilizeaza ca adaos in mediu de fermentatie sursa anorganica de vanadiu, solutie de ortovanadat de sodiu 3% si sursa anorganica de crom clorura cromica

d) Obtinerea compusilor antidiabetici pe baza de drojdie imbogatita in vanadiu si biomasa imbogatita in crom si vanadiu, prin separarea si purificarea si uscarea mediului fermentat

e) Determinarea continutului de vanadiu si crom total din biomasele uscate

2. Compusi antidiabetici mineralo-vitamino-proteic **caracterizati prin aceea ca** pot fi obtinuti prin procedeul descris conform revendicarii 1