



(51) МПК  
*С07Н 3/06* (2006.01)  
*С07Н 1/08* (2006.01)  
*С12Р 19/44* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*С07Н 3/06* (2006.01); *С07Н 1/08* (2006.01); *С12Р 19/44* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016152515, 30.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 30.12.2016

Дата регистрации:  
 22.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.12.2016

(45) Опубликовано: 22.03.2018 Бюл. № 9

Адрес для переписки:

690022, Приморский кр., г. Владивосток, пр-кт  
 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН,  
 патентный отдел

(72) Автор(ы):

Кусайкин Михаил Игоревич (RU),  
 Сильченко Артем Сергеевич (RU),  
 Расин Антон Борисович (RU),  
 Калиновский Анатолий Иванович (RU),  
 Ермакова Светлана Павловна (RU),  
 Звягинцева Татьяна Николаевна (RU),  
 Лю Чангхенг (CN),  
 Юань Венпен (CN),  
 Чжанг Мянсонг (CN),  
 Ся Айронг (CN),  
 Чжао Пейпей (CN)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 учреждение науки Тихоокеанский институт  
 биорганической химии им. Г.Б. Елякова  
 Дальневосточного отделения Российской  
 академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU),  
 Институт биологии Шандуньской академии  
 наук (CN)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: WO2006008379 A1, 26.01.2006.

СИЛЬЧЕНКО А.С. "Фукоиданазы и  
 альгинат-лиазы морской бактерии *Formosa  
 algae* КММ 3553Т и морского моллюска  
*Lambis sp.*", Диссертация на соискание  
 ученой степени канд. хим. наук. ТИБОХ  
 ДВО РАН, Владивосток, 2014, 141 с. WO  
 0017215 A1, 30.03.2000. SILCHENKO A. S. et  
 al. "Hydrolysis of Fucoidan by Fucoidanase  
 Isolated from (см. прод.)

(54) Новый сульфатированный фукоолигосахарид и способ его получения

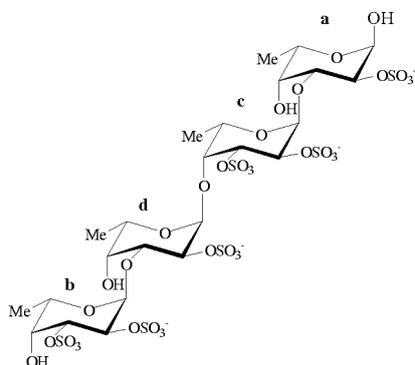
(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложены новый сульфатированный фукоолигосахарид формулы II, представленной на фиг.3, и способ его получения. Осуществляют обработку фукоидана из *Sargassum horneri* рекомбинантной

фукоиданазой FFA1 в Tris-HCl буфере с pH 7,2 при 37°C в течение 72-75 ч. Затем нагревают до 100°C в течение 5-10 мин. Далее высокомолекулярные продукты гидролиза осаждают 75% водным раствором этанола или ацетона. Затем образовавшийся осадок отделяют

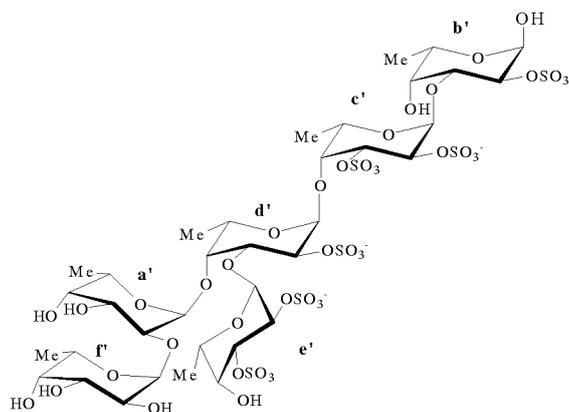
с помощью центрифугирования при 9000-10000 g в течение 20-30 мин. Супернатант наносят на колонку с анионообменным сорбентом, уравновешенную водой, и элюируют фукоолигосахариды линейным градиентом гидрокарбоната аммония со скоростью 1 мл/мин. Сначала элюируют сульфатированный

фукоолигосахарид формулы II, затем сульфатированный фукоолигосахарид формулы I. Полученные фракции целевых продуктов лиофильно высушивают. Изобретение расширяет арсенал сульфатированных фукоолигосахаридов, полученных из бурой водоросли *Sargassum horneri*. 2 н.п. ф-лы, 3 ил., 2 табл., 2 пр.



I

Фиг. 2



II

Фиг. 3

(56) (продолжение):

the Marine Bacterium, Formosa algae", *Mar. Drugs* 2013, v.11, p.2413-2430; doi:10.3390/md11072413.  
 BILAN M. I. et al. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag", *Carbohydr. Res.* 2002, v. 337. p.719-730. KUSAYKIN M. I. et al. "Fucoidanases", *Glycobiology*. Jan 2016, v. 26 iss.1, p.3-12, doi: 10.1093/glycob/cwv072. Epub 07.09.2015.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07H 3/06* (2006.01)  
*C07H 1/08* (2006.01)  
*C12P 19/44* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07H 3/06* (2006.01); *C07H 1/08* (2006.01); *C12P 19/44* (2006.01)(21)(22) Application: **2016152515, 30.12.2016**(24) Effective date for property rights:  
**30.12.2016**Registration date:  
**22.03.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **30.12.2016**(45) Date of publication: **22.03.2018** Bull. № 9

Mail address:

**690022, Primorskij kr., g. Vladivostok, pr-kt 100 let  
Vladivostoku, 159, TIBOKH DVO RAN, patentnyj  
otdel**

(72) Inventor(s):

**Kusajkin Mikhail Igorevich (RU),  
Silchenko Artem Sergeevich (RU),  
Rasin Anton Borisovich (RU),  
Kalinovskij Anatolij Ivanovich (RU),  
Ermakova Svetlana Pavlovna (RU),  
Zvyagintseva Tatyana Nikolaevna (RU),  
Lyu Changkheng (CN),  
Yuan Venpen (CN),  
Chzhang Myansong (CN),  
Sya Ajrong (CN),  
Chzhao Pejpej (CN)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe  
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoy khimii im. G.B. Elyakova  
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj  
akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU),  
Institut biologii Shandunskoj akademii nauk  
(CN)**(54) **NEW SULFATED FUCOOLIGOSACCHARIDE AND THE PROCESS FOR ITS PREPARATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

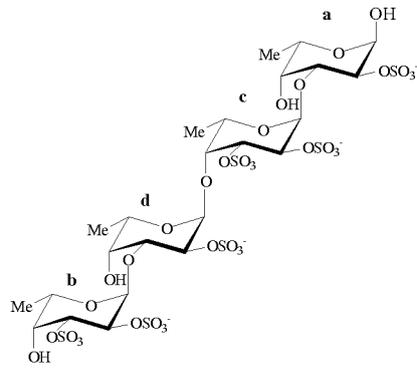
SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology. New sulfated fucooligosaccharide of formula II is proposed, 3, and a method for its receiving. Implement processing fucoidan from *Sargassum horneri* with recombinant fucoidanase FFA1 in Tris-HCl buffer at pH 7.2 at 37 °C for 72–75 hours. Solution is then heated to 100 °C for 5–10 minutes. Further, high molecular weight hydrolysis products are precipitated with a 75 % aqueous solution of ethanol or acetone. precipitate formed is then separated by centrifugation at 9,000–10,000 g for 20–30 minutes. Supernatant is

applied to a column with an anion-exchange sorbent, equilibrated with water, and the fucooligosaccharides are eluted with a linear gradient of ammonium hydrogen carbonate at a rate of 1 ml/min. First, a sulfated fucooligosaccharide of formula II is eluted, followed by a sulfated fucooligosaccharide of formula I. Obtained fractions of the desired products are lyophilized by drying.

EFFECT: invention extends the arsenal of sulfated fucooligosaccharides derived from the brown alga *Sargassum horneri*.

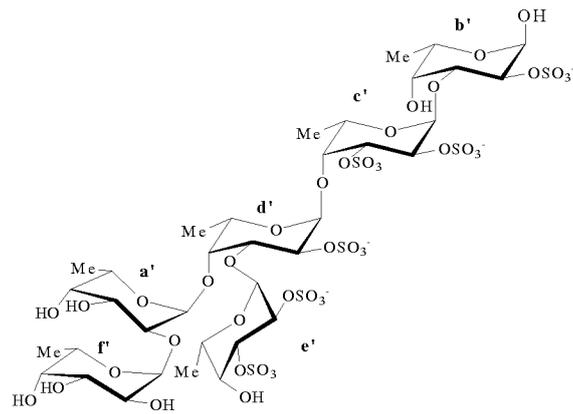
2 cl, 3 dwg, 2 tbl, 2 ex

C 1  
2 6 4 8 1 4 2  
R UR U  
2 6 4 8 1 4 2  
C 1



I

Фиг. 2



II

Фиг. 3

1 С 2 4 1 8 4 9 2 R U

R U 2 6 4 8 1 4 2 С 1

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения новых сульфатированных фукоолигосахаридов из фукоиданов. Эти соединения могут быть использованы в научных исследованиях, а также в медицине, косметологии, сельском хозяйстве.

5 Фукоиданы - сульфатированные гетерополисахариды бурых водорослей обладают широким спектром биологической активности [Fitton, J.H., Stringer, D.N., and Karpinić, S.S. (2015). Therapies from Fucoidan: An Update. *Marin Drugs* 13, 5920-5946]. Однако использование полимерных молекул в медицине практически невозможно из-за гетерогенности препаратов полисахаридов и невозможности их стандартизации.

10 Поэтому стоит проблема получения из фукоидана олигосахаридов, имеющих постоянные структуры и стандартные характеристики. Применение ферментов для деполимеризации биологически активных фукоиданов и получение олигосахаридов открывает новые возможности использования этих соединений в фармацевтике и косметологии [Kusaykin, M.I., Silchenko, A.S., Zakharenko, A.M., and Zvyagintseva, T.N. (2016). *Fucoidanases*. *Glycobiology* 26, 3-12].

15 Описано использование фукозилированных олигосахаридов в составе композиции, используемой для предупреждения и/или лечения атопического дерматита и экземы [RU 2586776 C2, 10.06.2016], желудочно-кишечной инфекции [WO2016139333 A1, 09.09.2016]. Предложены новые N-сульфатированные олигосахариды, стимулирующие образование сосудов [RU 2559629 C2, 10.08.2015], а также новые сульфатированные производные олигосахаридов, эффективные в качестве ингибиторов гепаринсульфат-связывающих белков [RU 2483074 C2, 27.05.2013]. Известны фукоолигосахариды, которые могут быть использованы для защиты растений от патогенов [US 6984630 B1, 10.01.2006].

25 По сравнению с получением сульфатированных олигосахаридов многостадийным методом органического синтеза, ферментативное получение подобных олигосахаридов из фукоиданов отличается меньшей трудоёмкостью, существенно меньшим числом стадий получения и высоким выходом продуктов реакции.

30 Описано получение фукоолигосахаридов из фуканов деполимеризацией с помощью бактериальных эндофуканаз [US 6984630 B1, 10.01.2006].

Описано получение фукоолигосахаридов, используемых в области гликотехнологии, с помощью ферментов из фукоидана, полученного из бурых водорослей порядка *Laminariales*. [US 6927289 B2, 09.08.2005].

35 Раннее нами были получены фукоолигосахариды ферментативным гидролизом фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*. Для этого фукоидан смешивали с нативной фукоиданазой FFA из морской бактерии *Formosa algae* в 0,015 М Na-фосфатном буфере, pH 7,2 и инкубировали в течение 72 ч при 25°C. Высокомолекулярные продукты гидролиза осаждали 75% водным раствором этанола. Выпавший осадок центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Супернатант упаривали на ротаторном испарителе, растворяли в дистиллированной воде и наносили на термостатируемую колонку с биогелем P-6, уравновешенную водой. Фукоолигосахариды элюировали со скоростью 0,7 мл/мин. Присутствие сахаров в исследуемых фракциях проверяли фенол-серноокислотным методом. Низкомолекулярные фракции олигосахаридов объединяли, концентрировали на ротаторном испарителе и рехроматографировали. В результате 40 получали дисахариды [Сильченко А.С. Фукоиданазы и альгинат-лиазы морской бактерии *Formosa algae* КММ 3553Т и морского моллюска *Lambis* sp: диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 2014, стр. 69].

На фиг. 1 (А, Б) представлены структуры дисахаридов.

Задача изобретения – расширение арсенала сульфатированных фукоолигосахаридов. Задача решена разработкой способа их получения из фукоидана, выделенного из бурой водоросли *Sargassum horneri*.

5 Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в получении новых сульфатированных фукоолигосахаридов постоянной структуры из фукоидана из *Sargassum horneri*.

В доступной патентной и другой научно-технической литературе заявляемые сульфатированные фукоолигосахариды не обнаружены.

10 Заявляемый сульфатированный фукоолигосахарид формулы I состоит из остатков фукозы ( $n=4$ ), связанных чередующимися  $1\rightarrow3;1\rightarrow4$  гликозидными связями, сульфатные группы расположены при C2 в  $1\rightarrow3$ -связанных остатках фукозы, и при C2 и C3 в  $1\rightarrow4$ -связанных остатках фукозы.

15 На фиг. 2 представлена структура сульфатированного фукоолигосахаарида формулы I.

Заявляемый сульфатированный фукоолигосахарид формулы II состоит из остатков фукозы ( $n=6$ ), связанных чередующимися  $1\rightarrow3;1\rightarrow4$  гликозидными связями, сульфатные группы расположены при C2 в  $1\rightarrow3$ -связанных остатках фукозы, и при C2 и C3 в  $1\rightarrow4$ -связанных остатках фукозы, к третьему моносахаридному остатку, которого  
20 присоединена боковая цепь с  $1\rightarrow4$  гликозидной связью, состоящая из 2 остатков несulfатированной фукозы, связанных между собой  $1\rightarrow2$  гликозидной связью.

На фиг. 3 представлена структура сульфатированного фукоолигосахаарида формулы II.

Заявляемый способ получения сульфатированных фукоолигосахаридов формул I и  
25 II заключается в том, что рекомбинантную фукоиданазу FFA1 в Tris-HCl буфере pH 7,2 смешивают с 5-10% раствором фукоидана из *Sargassum horneri*, смесь инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 72-75 часов, затем нагревают до  $100^{\circ}\text{C}$  в течение 5-10 мин, далее высокомолекулярные продукты гидролиза осаждают 75% водным раствором этанола или ацетона, затем образовавшийся осадок отделяют с помощью центрифугирования  
30 при 9000-10000 g в течение 20-30 мин, а супернатант наносят на колонку с анионообменным сорбентом, уравновешенную водой, и элюируют фукоолигосахариды линейным градиентом гидрокарбоната аммония со скоростью 1 мл/мин, сначала сульфатированный фукоолигосахарид формулы II, затем сульфатированный фукоолигосахарид формулы I, далее полученные фракции целевых продуктов лиофильно  
35 высушивают.

Рекомбинантную фукоиданазу FFA1 получают известным способом [Сильченко А.С. Фукоиданазы и альгинат-лиазы морской бактерии *Formosa algae* KMM 3553T и морского моллюска *Lambis* sp: диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, 2014, стр. 110].

40 Фукоидан получают из бурой водоросли *Sargassum horneri* по известной методике [Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., et.al. (1999). A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* 322, 32-39].

Изобретение иллюстрируется примерами конкретного выполнения.

#### ПРИМЕР 1

45 Рекомбинантную фукоиданазу FFA1 (1 мг) в Tris-HCl буфере, pH 7,2 смешивают с 5% раствором фукоидана из *Sargassum horneri*. Смесь инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 72 ч, затем нагревают до  $100^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин. Образовавшийся осадок отделяют с помощью центрифугирования и отбрасывают. В супернатант добавляют этанол до

достижения его концентрации 75%. Выпавший осадок (высокомолекулярная фракция) центрифугируют при 9000 g в течение 20 мин. Супернатант (низкомолекулярная фракция) наносят на колонку с сорбентом Q-Sepharose, уравновешенную водой. Олигосахариды элюируют линейным градиентом гидрокарбоната аммония со скоростью 1 мл/мин, сначала сульфатированный фукоолигосахарид формулы II, затем сульфатированный фукоолигосахарид формулы I. Полученные фракции олигосахаридов лиофильно высушивают. Выход целевых продуктов составляет 5-15% от веса низкомолекулярной фракции.

#### ПРИМЕР 2

Рекомбинантную фукоиданазу FFA1 (1 мг) в Tris-HCl буфере, pH 7,2 смешивают с 10% раствором фукоидана из *Sargassum horneri*. Смесь инкубируют при 37°C в течение 75 ч, затем нагревают до 100°C в течение 10 мин. Образовавшийся осадок отделяют с помощью центрифугирования и отбрасывают. В супернатант добавляют ацетон до достижения его концентрации 75%. Выпавший осадок (высокомолекулярная фракция) центрифугируют при 10000 g в течение 30 мин. Супернатант (низкомолекулярная фракция) наносят на колонку с сорбентом Mono-Q, уравновешенную водой. Олигосахариды элюируют линейным градиентом гидрокарбоната аммония со скоростью 1 мл/мин, сначала сульфатированный фукоолигосахарид формулы II, затем сульфатированный фукоолигосахарид формулы I. Полученные фракции олигосахаридов лиофильно высушивают. Выход целевых продуктов составляет 7-20% от веса низкомолекулярной фракции.

Структура полученных олигосахаридов была установлена с помощью ЯМР спектроскопии.

На  $^1\text{H}$ -спектре олигосахарида формулы I были обнаружены химические сдвиги, принадлежащие четырём разным остаткам  $\alpha$ -метил-L-фукопиранозида, обозначенным буквами a-d, представленные в таблице 1. С помощью спектров 1DТОХУ и COSY были определены хим. сдвиги, принадлежащие каждому остатку, и их последовательность.

Из HSQC-спектра было установлено соотношение между хим. сдвигами  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Спектр ROESY показал корреляцию между H1 остатка d и H4 остатка c, H1 остатка c и H3 остатка a, H1 остатка b и H3 и H4 остатка d. В спектре НМВС наблюдалась связь между C1 остатка d и H4 остатка c, C1 остатка c и H3 остатка a, C1 остатка b и H3 и остатка d. Аналогично протоны d1, c1 и b1 коррелировали с атомами углерода c4, a3 и d3 соответственно. На основании этого был сделан вывод, что олигосахарид формулы I имеет углеродный скелет  $\alpha\text{-L-Fucp-1}\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp-1}\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp-1}\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}$ .

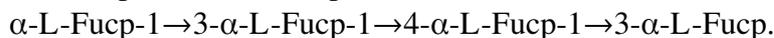
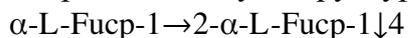
Спектр  $^1\text{H}$  снят при 700 MHz, 308 K, хим. сдвиги измерены относительно хим. сдвига ацетона 2,225. Спектр  $^{13}\text{C}$  снят при 700 MHz, 308 K, хим. сдвиги измерены относительно хим. сдвига ацетона 31,45.

Аналогичным образом была установлена структура олигосахарида формулы II.  $^1\text{H}$ -спектр показал наличие шести разных моносахаридных остатков. Спектры 1DТОХУ, COSY и HSQC позволили установить протонные и углеродные хим. сдвиги каждого из них, представленные в таблице 2.

На спектре ROESY наблюдается корреляция между H1 остатка a' и H4 остатка d', H1 остатка e' и H3 остатка d', H1 остатка d' и H4 остатка c', H1 остатка c' и H3 остатка b', H1 остатка f' и H2 остатка a'. В спектре НМВС атомы углерода a'1, d'1, e'1, f'1, c'1 коррелируют с протонами d'4, c'4, d'3, a'2 и b'3 соответственно, а протоны a'1, e'1, f'1, d'1 – с атомами углерода d'4, d'3, a'2, c'4 соответственно. Кроме того, в спектре НМВС наблюдается связь атома углерода b'3 с протоном c'1 или d'1.

Спектр  $^1\text{H}$  снят при 700 МГц, 308 К, хим. сдвиги измерены относительно хим. сдвига ацетона 2,225. Спектр  $^{13}\text{C}$  снят при 700 МГц, 308 К, хим. сдвиги измерены относительно хим. сдвига ацетона 31,45.

5 На основании вышесказанного был сделан вывод, что олигосахарид формулы II имеет разветвлённую структуру вида



10 Положение сульфатов в моносахаридных остатках было установлено путём сравнения сдвигов их протонов с фукозой ( $\text{H1} = 5,19$ ,  $\text{H2} = 3,76$ ,  $\text{H3} = 3,85$ ,  $\text{H4} = 3,80$ ,  $\text{H5} = 4,19$ ,  $\text{H6} = 1,20$ ) и сдвигов их углеродных атомов с  $\alpha$ -метил-L-фукопиранозидом ( $\text{C1} = 100,5$ ,  $\text{C2} = 69,0$ ,  $\text{C3} = 70,6$ ,  $\text{C4} = 72,9$ ,  $\text{C5} = 67,5$ ,  $\text{C6} = 16,5$ ). Сульфатирование в положении 2 было вычислено из смещения  $\text{H2}$  в слабое поле на 0,8-0,9 ppm относительно фукозы и  $\text{C2}$  – на 4-6 ppm относительно  $\alpha$ -метил-L-фукопиранозида. По сдвигу  $\text{H3}$  в слабое поле на

15 0,9-1,0 ppm и  $\text{C3}$  – на 4-6 ppm было установлено наличие сульфатов в положении 3.

Заявляемые сульфатированные фукоолигосахариды используют в научных исследованиях в качестве субстратов фукоиданаз, фукозидаз и сульфатаз.

#### (57) Формула изобретения

1. Способ получения сульфатированных фукоолигосахаридов формулы I, 20 представленной на фиг. 2, и формулы II, представленной на фиг. 3, заключающийся в том, что рекомбинантную фукоиданазу FFA1 в Tris-HCl буфере, pH 7,2 смешивают с 5-10% раствором фукоидана из *Sargassum horneri*, смесь инкубируют при 37°C в течение 72-75 ч, затем нагревают до 100°C в течение 5-10 мин, далее высокомолекулярные

25 продукты гидролиза осаждают 75% водным раствором этанола или ацетона, затем образовавшийся осадок отделяют с помощью центрифугирования при 9000-10000 g в течение 20-30 мин, а супернатант наносят на колонку с анионообменным сорбентом, уравновешенную водой, и элюируют фукоолигосахариды линейным градиентом гидрокарбоната аммония со скоростью 1 мл/мин, сначала сульфатированный

30 фукоолигосахарид формулы II, затем сульфатированный фукоолигосахарид формулы I, далее полученные фракции целевых продуктов лиофильно высушивают.

2. Сульфатированный фукоолигосахарид формулы II, представленной на фиг. 3.

35

40

45

Новые сульфатированные  
фукоолигосахариды и способ их  
получения

Таблица 1

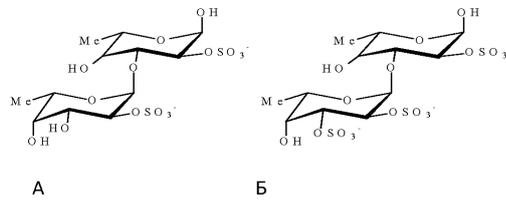
Остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6
a	5,50	4,54	4,06	4,09	4,24	1,24
b	5,39	4,58	4,72	4,22	4,59	1,26
c	5,37	4,65	4,76	4,27	4,57	1,41
d	5,30	4,59	4,20	4,12	4,44	1,30
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
a	91,74	74,62	74,99	70,40	67,12	16,65
b	95,86	73,61	76,33	71,81	67,74	16,44
c	96,32	73,68	75,16	80,54	69,07	16,85
d	99,93	74,62	74,49	70,62	68,28	16,51

Таблица 2

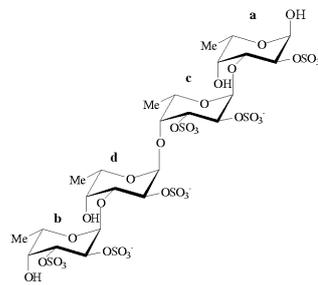
Остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6
a'	5,58	3,74	4,13	3,86	4,33	1,26
b'	5,50	4,54	4,05	4,09	4,23	1,24
c'	5,38	4,64	4,75	4,29	4,56	1,41
d'	5,37	4,70	4,20	4,44	4,43	1,41
e'	5,34	4,58	4,83	4,24	4,61	1,25
f'	5,11	3,83	3,91	3,80	4,32	1,20
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
a'	98,57	79,84	69,64	73,90	68,41	16,71
b'	91,75	74,61	74,86	70,31	67,10	16,66
c'	96,20	73,75	75,30	80,70	69,13	17,03

d'	100,14	75,41	77,54	79,16	70,00	17,36
e'	98,28	73,88	76,43	71,81	67,70	16,55
f'	100,67	69,33	70,36	73,20	67,99	16,49

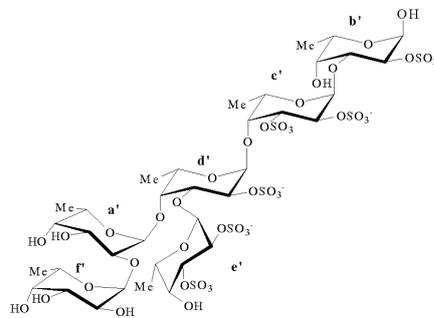
Новые сульфатированные  
фукоолигосахариды и способ их  
получения



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3