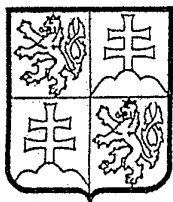


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 359

(21) Číslo přihlášky : 6762-89.Z

(22) Přihlášeno : 30 11 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno : 11 06 91

(47) Uděleno : 20 03 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 13 05 92

(73) Majitel patentu : GALENA s.p., OPAVA-KOMÁROV

(72) Původce vynálezu : POVAŽSKÁ HANA Pharm.Dr., VALÍK JOSEF RNDr.,
MALINKA ZDENĚK RNDr., SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA
STUHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ

(54) Název vynálezu : Nový průmyslový kmen mikroorganismu
Claviceps purpurea (Fr.) TUL.CCM 8057

(57) Anotace :

Účelem řešení je zabezpečení vhodné surovinové základny pro výrobu námelových alkaloidů ergotoxinové skupiny, zejména ergokorninu, popřípadě pro výrobu polosyntetických derivátů kyseliny lysergové. Surovinou pro tyto výroby jsou sklerocia námele, získaná parazitní kultivací. Uvedeného účelu se dosáhne vypěstováním sklerocií nového průmyslového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. CCM 8057 na žitě v množství nejméně 960 kg/ha a použitím těchto sklerocií k výrobě substancí nativních nebo polosyntetických námelových alkaloidů. Sklerocia obsahují námelové alkaloidy v množství 0,52 % až 1,25 % sušiny biomasy, minimálně 93,5 % sumy alkaloidů je tvořeno směsí ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu v poměru 4,2 : 1,6 : 1.

Vynález se týká nového průmyslového kmene mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. CCM 8057, vyznačujícího se při polní kultivaci na žitě velmi vysokými hektarovými výnosy námelových sklerocií s vysokým obsahem ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu a minimálním zastoupením nežádoucích doprovodných alkaloidů.

Ergokornin, alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin jsou ergotoxinové alkaloidy s významnými léčivými účinky. Tyto alkaloidy lze v terapeutické praxi využít samostatně nebo ve směsích. Ergokornin je v současné terapeutické praxi používán ve směsi s alfa-ergokryptinem, beta-ergokryptinem a ergokristinem v přesně definovaném poměru pod obchodním názvem Secatoxin. S výhodou je možno využít terapeutických vlastností ergokorninu samotného nebo ve směsi s ergokristinem. Směs alkaloidů může být použita jako výchozí surovina pro výrobu polosyntetických derivátů s širokým spektrem účinků.

Pro výrobu ergokorninu ve směsi s alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem je v současné době využívána řada kmenů *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., popsáných v odborné a patentové literatuře. Hlavním nedostatkem těchto kmenů je nízký obsah žádoucích námelových alkaloidů, nepříznivý vzájemný poměr ergokorninu k alfa a beta-ergokryptinu a vysoký obsah nežádoucích doprovodných alkaloidů.

Tyto nedostatky do určité míry odstranil vynález (čs. autorské osvědčení č. 239 884), kterým je nový průmyslový kmen CCM F-734, produkující námelovou drogu s příznivějším poměrem jednotlivých složek ve směsi alkaloidů a vysokým hektarovým výnosem nejméně 840 kg/ha. Vysoké výnosy jsou dány vysokou schopností tohoto kmene infikovat hostitelskou rostlinu. Nedostatkem tohoto kmene je však poměrně nízký obsah námelových alkaloidů (nejméně 0,32 %), způsobující vyšší náklady na získávání alkaloidů z námelové drogy.

Uvedené nedostatky kmenů námele pro polní produkci ergotoxinových alkaloidů odstraňuje do značné míry vynález, jímž je nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., uložený v čs. sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod označením CCM 8057.

Hlavní výhodou tohoto kmene je při kultivaci na žitě vysoká produkce sumy alkaloidů ve sklerociích, která dosahuje průměru 0,91 % (minimum 0,52 %) sušiny biomasy. Další výhodou je velmi nízká tvorba nežádoucích doprovodných alkaloidů, které tvoří nejvýše 6,5 % sumy alkaloidů. Ergotoxinové alkaloidy tvoří nejméně 93,5 % celkové sumy alkaloidů v poměrném průměrném zastoupení ergokorninu : alfa-ergokryptinu : beta-ergokryptinu = 4,2 : 1,6 : 1. Kmen lze s výhodou použít k získání námelové drogy pro izolaci této směsi ergotoxinových alkaloidů i pro izolaci ergokorninu a ergokryptinů zvlášť. Nový kmen se také vyznačuje vysokou schopností infikovat hostitelskou rostlinu, která umožňuje při recentně užívané agrotechnice pěstování námele dosahovat hektarového výnosu námelové drogy minimálně 960 kg/ha. Vlastnosti nového kmene umožňují zefektivnit postupy extrakce a izolace při výrobě námelových alkaloidů, zejména snížením spotřeby surovin, energie a pracnosti. Sklerocia tohoto kmene mohou být také použita jako výchozí surovina pro výrobu polosyntetických derivátů.

Popis vlastností nového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. CCM 8057:

Při saprofytním růstu na sladinné půdě ztužené agarem tvoří houba kolonie z typického sfaceliového vzdušného mycelia. Mycelium je bohatě větvené, bílé a postranní hyfy jsou ukončeny konidiogenními buňkami. Konidie mají průměrné rozměry 7,4 x 3,8 mikrometrů. Mladé kultury jsou bílé, starší jsou slabě růžovofialově pigmentované.

Při parazitní kultivaci na žitě tvoří houba tmavá, fialově pigmentovaná sklerocia o váze v rozmezí 0,016 až 0,105 g (průměr 0,046 g). Sklerocia tohoto kmene obsahují námelové alkaloidy v množství od 0,52 % do 1,25 % sušiny biomasy, při průměru 0,91 %. Minimálně 93,5 % sumy alkaloidů je tvořeno ergokorninem, alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem. Poměr ergokorninu ku ergokryptinům je 1,62 : 1, poměr alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu je 1,6 : 1. Doprovodnými alkaloidy jsou zejména ergometrin, dále ergokornam a klavinové alkaloidy.

Nový produkční kmen byl vyšlechtěn z původního produkčního kmene CCM F - 734. Sklerocium tohoto kmene obsahující 0,72 % sumy alkaloidů s poměrným zastoupením ergokorninu ku alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu 2,6 : 1,3 : 1 bylo převedeno do saprofytní kultury a vytvořené konidie byly ozařovány UV zářením o výkonu $15 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ po dobu 185 s, kdy přežívalo 0,50 % konidií. Po ozáření byla suspenze spor monosporicky rozizolována. Postup UV- mutagenese a monokonidiové izolace byl opakován za stejných podmínek třikrát. Kultury z jednotlivých monokonidiových izolátů byly naočkovány na žito. Vzniklá sklerocia byla jednotlivě izolována. Z analyzovaných sklerocií bylo pro další šlechtění vybráno sklerocium s obsahem sumy alkaloidů 1,05 %, ergokorninem, alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem v poměru 3,5 : 1,1 : 1. Sklerocium bylo převedeno do saprofytní kultury. Připravená suspenze konidií byla podrobena UV- mutagenesi a následné monokonidiové izolaci opakovaně třikrát. Takto získané kultury monokonidiových izolátů byly naočkovány na žito. Na základě hodnocení jednotlivých mutovaných monokonidiových izolátů, tj. stanovení jejich infekceschopnosti a analýzy námelových alkaloidů v souboru sklerocií byl vybrán kmen označený CCM 8057, který se vyznačuje uvedeným výhodným spektrem alkaloidů, minimem doprovodných nežádoucích alkaloidů a velmi vysokou infekceschopností. Stabilita těchto vlastností byla potvrzena opakovanou kultivací na žitě ve dvou vegetačních obdobích na šesti rozdílných lokalitách.

Způsob kultivace nového kmene pro získání výchozí suroviny k izolaci ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu a následné výrobě finálních produktů z těchto alkaloidů je doložen v příkladu použití, aniž by se tímto příkladem jakkoli omezovaly vlastnosti nového kmene, způsob jeho kultivace a použití ve výrobě.

Příklad použití:

Z potřebného objemu saprofytní kultury kmene CCM se připraví vodná suspenze konidií. Suspenzí konidií se pomocí očkovacího stroje naočkují klasy žita ve fázi metání tak, že na plochu 1 ha se použije $5 \cdot 10^{11}$ živých konidií. Po 35 až 60 denním růstu na žitě se provede sběr narostlých sklerocií námele. Z jednoho hektaru žita bylo získáno 1 020 kg suchých sklerocií námele, obsahujících 0,91 % sumy alkaloidů, ze které bylo 97,5 % tvořeno ergokorninem, alfa a beta-ergokryptinem ve vzájemném poměru 4,2 : 1,6 : 1, zbytek byl tvořen ergometrinem, ergokornamem a klavinovými alkaloidy.

Získaná droga byla vyextrahována, extrakty byly zčásti izolovány na jednotlivé alkaloidy a použity pro výrobu preparátu ergotoxinu, zčásti použity k výrobě směsi alkaloidů s vysokým podílem ergokorninu a zčásti použity pro výrobu polosyntetických derivátů.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. CCM 8057 produkující ergokornin, alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin.