



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

**232604**  
(11) (B1)

(22) Prihlášené 27 07 81  
(21) (PV 5702-81)

(40) Zverejnené 17 07 84

(45) Vydané 15 12 86

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 1/00  
C 07 G 17/00  
A 61 K 31/56

(75)

Autor vynálezu

FUSKA JÁN ing. CSc., PROUSEK JOZEF ing. CSc., FUSKOVÁ ALŽBETA ing.,  
BRATISLAVA, KHANDLOVÁ ALŽBETA, JUR pri Bratislave

## (54) Spôsob prípravy metabolitu s protinádorovými účinkami biotransformáciou withaferinu A

1

2

Vynález rieši spôsob prípravy metabolitu s protinádorovými účinkami biotransformáciou withaferínu. A tak, že sa do tekutého média obsahujúceho zdroj uhlíka, organického dusíka a minerálne soli naočkuje kultúra *Cunninghamella elegans* NRRL 1393, pridá naraz alebo po častiach 10 až 200 mg na 100 ml pôdy withaferínu A, rozpusteného v polárnom rozpúšťadle, s výhodou v dimetylformamide, pri teplote 26 až 36 °C za stáleho miešania a prevzdušňovania sa kultivuje 96 až 168 hodín. Ďalej sa filtrát fermentovanej pôdy extrahuje esterami kyseliny octovej, s výhodou octanom etylným a extrakt sa odparí dosucha, prečistí na stĺpci silikagélu s použitím elučného činidla octanu etylného. Eluát sa zahusťí pri teplote 40 °C a kryštalizuje sa pri teplote 4 °C. Postupovať sa môže aj tak, že sa filtrát fermentovanej pôdy extrahuje chlórovanými uhlíkmi s počtom 1 až 5 uhlíkov, s výhodou dichlórmetánom. Pevný metabolit sa rekryštalizuje, s výhodou zo zmesi octanu etylného a acetónu.

Vynález sa týka spôsobu prípravy metabolitu inhibujúceho rast nádorov, ktorý sa získa biotransformáciou withaferinu A pomocou mikroorganizmu *Cunninghamella elegans* (NRRL 1393).

Withaferin A je prírodná látka steroidnej štruktúry, ktorá bola izolovaná z listov rastlín *Withania somnifera*, popísaná Yardonom a Laviem, *J. Chem. Soc.*, 2925, 1962 a z *Acnistus arborescens*, popísaná Kupchan a spoluautormi v *J. Amer. Chem. Soc.* 37. 5803, 1965. Withaferin A je účinný inhibitor rastu rastlinných a živočíšnych buniek, ako to popísal Shohat, *Z. Krebsforsch.* 30, 97, 1973 a podľa Shohata a spoluautorov, *Cancer Lett.* 2, 71, 1976, výrazne inhibuje rast nádorových buniek *in vitro* a *in vivo*. Niektoré mikroorganizmy sú schopné biotransformovať withaferin A pridaný do kultivačného média na nové metabolity. J. P. Rosazza a spoluautori, *Steroids* 31, 671, 1978, izolovali novým metabolit vznikajúci z withaferinu A pomocou *Cunninghamella elegans* (NRRL 1393), ktorý identifikovali ako 14 $\alpha$ -hydroxywithaferin A. Nový metabolit inhiboval bunky sarkómu 180 a lymfocytómu P 368 výraznejšie, ako pôvodný withaferin A.

V predkladanom riešení je popísaný spôsob prípravy metabolitu s protinádorovými účinkami biotransformáciou withaferinu A, podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že sa do tekutého média obsahujúceho zdroj uhlí-

ka, organického dusíka a minerálne soli naočkovaného kultúrou vyššie uvedeného mikroorganizmu pridá naraz alebo po častiach 10 až 200 mg na 100 ml pôdy withaferinu A rozpusteného v polárnom rozpúšťadle, s výhodou v dimetylformamide, pri teplote 26 až 36 °C za stáleho miešania a prevzdušňovania sa kultivuje 96 až 168 hodín. Ďalej sa filtrát fermentovanej pôdy extrahuje esterami kyseliny octovej, s výhodou octanom etylnatým a získaný extrakt sa odparí dosucha, prečistí na stĺpci silikagélu s použitím elučného činidla octanu etylnatého, eluát sa zahusťuje pri teplote do 40 °C a kryštalizuje sa pri teplote 4 °C. Postupovať sa môže aj tak, že sa extrahuje chlorovanými uhľovodíkmi s počtom 1 až 5 uhlíkov, s výhodou dichlórmetánom. Pevný metabolit sa výhodne rekryštalizuje zo zmesi octanu etylnatého a acetónu.

Metabolit s protinádorovými účinkami pripravený biotransformáciou withaferinu A podľa vynálezu sa svojimi vlastnosťami odlišuje od pôvodného withaferinu A, aj od 14 $\alpha$ -hydroxywithaferinu A, pripraveného z neho biotransformáciou. Nový metabolit sa získa v množstve 15 až 28 %, vzhľadom k použitému withaferinu A. Spolu s uvedenými tromi látkami je vo filtráte po skončenej biotransformácii prítomná i ďalšia nová látka. Látky sa od seba navzájom odlišujú hodnotami  $R_f$  i farebnými reakciami, ako je vidieť z tabuľky 1.

Tabuľka 1

Chromatografické stanovenie withaferinu A a jeho metabolitov

Látka	$R_f$	Farebná reakcia
withaferin A	0,410	staroružová
14- $\alpha$ -hydroxywithaferin	0,170	hnedá
nový metabolit I	0,280	fialová
nový metabolit II	0,750	šedomodrá

Na delenie sa použila sústava octanu etylnatého:

acetón (4:2), detekčné činidlo p-anizaldehyd, po postriekaní sa chromatogramy zohriali na 120 °C. Všetky uvedené látky možno detegovať tiež bioautodetekciou pri použití *Staphylococcus pyogenes aureus* R 50.

Metabolit podľa vynálezu v pokusoch *in vitro* inhibuje biochemické reakcie a rast buniek P 388 a v pokusoch *in vivo* vykazuje výraznejšiu inhibíciu rastu nádorov, ako pôvodný withaferin A. V koncentráciách nižších ako 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  metabolit podľa vynálezu inhiboval rast *Staphylococcus pyogenes aureus* R 50, *Bacillus subtilis* SDPC 1:220, *Bacillus megatherium*, *Sarcina flava*, v koncentráciách do 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  však neinhiboval rast *Escherichia coli*, *Candida albicans* Pu 10 a *Pseudomonas aeruginosa*.

Spôsob prípravy metabolitu biotransformáciou withaferinu A a jeho izolácia sú uvedené v príkladoch.

#### Príklad 1

Do 20 vlných baniek o objeme 500 ml pripravilo sa po 100 ml média nasledujúceho zloženia: glukóza 2 g, kvasničný extrakt 0,5 g, sójová múka 0,5 g, NaCl 0,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g a doliala sa destilovaná voda do 100 ml, pH upravilo na 7,0. Po sterilizácii počas 20 minút pri 120 °C a ochladení sa médium naočkovovalo 15 ml vegetatívneho inokula *Cunninghamella elegans* (NRRL 1393) a kultivuje sa 72 hodín. Kultivovalo sa na rotačnej trepačke pri 220 ot.  $\text{min}^{-1}$  a pri teplote 28 °C. Po 24 hodín kultivácie sa pridalo do každej banky 50 mg withaferinu A rozpusteného v 0,5 ml dimetylformamidu. Kultivácia pokračovala do 120 hodiny. Filtrát po kultivácii obsahuje stopy withaferinu A,

14 $\alpha$ -hydroxywithaferinu A a metabolia podľa vynálezu v množstve 20 mg. 100 ml<sup>-1</sup> doteraz nestanovenej štruktúry.

#### Príklad 2

Do 500 ml varných baniek sa naplní po 100 ml média zloženia ako je uvedené v príklade 1. Toto sa po sterilizácii počas 20 minút pri 120 °C ochladí a naočkuje 15 ml vegetatívneho inokula *Cunninghamella elegans* (NRRL 1393). Po 24 hodinách kultivácie na rotačnej trepačke pri 220 ot. min<sup>-1</sup> a teplote 28 °C sa do každej banky pridá 25 mg withaferinu A rozpustného v 0,25 ml dimetylformamidu a po 72 hodinách kultivácie sa pridá opäť 25 mg withaferinu A rozpusteného v dimetylformamide. Kultivácia sa ukončila po 144 hodine. Filtrát média obsahoval okrem nebiotransformovaného withaferinu A, tiež 14 $\alpha$ -hydroxywithaferin a metabolit I (viz v tabuľke 1) v koncentrácii 23 mg. ml<sup>-1</sup>.

#### Príklad 3

Do fermentačného tanku o objeme 20 litrov z nerezovej ocele, opatreného miešadlom a vzdušniacim zariadením sa pripraví 10 litrov média nasledujúceho zloženia: glukóza 200 g, kvasničný extrakt 50 g, sójová múka 50 g, NaCl 50 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 g, sójový olej 10 ml, vodovodná voda 10 l, hodnota pH 7,0. Po sterilizácii počas 30 min pri 120 °C sa ochladené médium naočkovalo 15 % vegetatívneho inokula mikroorganizmu *Cunninghamella elegans* (PRRL 1393). Po 24 hodinovej kultivácii pri 28 °C za neustáleho miešania pri 200 otáčkach miešadla. min<sup>-1</sup> a vzdušnenia, tak, aby na objem média bol privádzaný objem vzduchu sa do kultivačného média pridalo 2,5 g withaferinu A rozpusteného v 25 ml dimetylformamidu. Kultivácia bola ukončená po 96 hodinách. Filtrát obsahoval stopy withaferinu A a nový metabolit I v koncentrácii 15 mg. 100 ml<sup>-1</sup>.

#### Príklad 4

Obsah 20 baniek po skončenej kultivácii, ako je uvedené v príklade 1, sa spojí a mycélium sa oddelí filtráciou. Filtračný koláč sa na filtri premyje 50 ml destilovanej vody. Získaný filtrát 1450 ml včítane 50 ml premývacej vody 50 ml sa premieša a pH sa upraví na hodnotu 7,0 prídavkom kyseliny chlorovodíkovej. Ďalej sa pridá 700 ml octanu etylnatého a filtrát sa za neustáleho miešania extrahuje 20 až 40 min. Oddelená vrstva rozpúšťadla sa odpustí a ostávajúci filtrát sa rovnakým postupom extrahuje ešte trikrát po sebe octanom etylnatým v objemovom pomere 1 : 2. Získané extrakty sa spoja, prídavkom bezvodého síranu sodného vysušia a za zníženého tlaku pri teplote do 45 °C sa rozpúšťadlo odparí. Získa sa 985 mg surového produktu, ktorý sa

prečistí na stĺpci silikagelu 125 až 180 ok, kolóna 4 X 36 cm. Ako elučné činidlo sa použije zmes rozpúšťadiel octan etylnatý : acetón (4 : 1). Na základe analýzy na tenkej vrstve sa zachytené frakcie po 25 ml spoja a znova odparia do sucha. Spojením frakcií 1 až 11 sa získa ostávajúci 159 mg withaferinu A a z frakcií 20 až 40 sa získa 198 mg nového metabolitu. Konverzia, vzhľadom na použité množstvo withaferinu A, je 23,5 %.

#### Príklad 5

189 mg surového, prečisteného metabolitu získaného postupom uvedeným v príklade 4 sa rekryštalizuje z horúcich roztokov octanu etylnatého, prípadne zo zmesi octan etylnatý : acetón (1 : 1). Získa sa 160 mg čistej kryštalickej látky, bielej farby s t. t. 118 až 120 °C (bez korekcie). Výsledky elementárnej analýzy látky sú nasledovné:

C 66,09 %, H 7,95 %, O 16,03 %.

Infračervené spektrum merané v roztoku CDCl<sub>3</sub> vykazovalo max. pri:

920, 962, 1005, 1018, 1032, 1058, 1129, 1139, 1185, 1317, 1264, 1392, 1449, 1455, 1682, 1688, 2875, 2932, 2958, 3460, 3570 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR spektrá boli merané pri 99,54 MHz s použitím Fourierovej transformácie pri 21 °C v CDCl<sub>3</sub> za použitia tetrametylsilánu, ako vnútorného štandardu. Chemické posuny sú uvedené v ppm, vzhľadom k Me<sub>4</sub>Si. Priemerná šírka spektra 200 Hz, čas jednotlivých impulzov 2 s, počet akumulácií 16, počet bodov 8192, šírka trubice 10 mm. V <sup>1</sup>H-NMR spektre vykazuje izolovaný metabolit nasledujúce chemické posuny:

0,715 s (18-CH<sub>3</sub>);  
1,12 d (J = 6,35 Hz);  
1,255 s;  
1,411 s (19-CH<sub>3</sub>);  
2,009 s;  
2,034 s (28-CH<sub>3</sub>);  
3,77 d (J = 5,86 Hz);  
4,363 s (H-27);  
6,198 d (J = 10,25 Hz, H-2);  
6,963 dd (J<sub>1</sub> = 9,77 Hz, J<sub>2</sub> = 5,37 Hz, H-3).

<sup>13</sup>C-NMR spektra boli merané pri 25,00 MHz za použitia Fourierovej transformácie pri 21 °C v CDCl<sub>3</sub> pri použití tetrametylsilánu ako vnútorného štandardu. Chemické posuny sú uvedené v ppm, vzhľadom k Me<sub>4</sub>Si. Priemerná šírka spektra 6000 Hz, počet akumulácií 40 000, počet bodov 8192, šírka trubice 10 mm. V <sup>13</sup>C-NMR spektra (C<sub>28</sub>):

7,488; 14,626; 17,375; 20,088; 23,460; 26,912; 28,667; 29,661; 30,714; 31,885; 32,821; 37,852; 43,000; 47,330; 47,662; 52,595; 54,292; 57,334;

62,658; 63,711; 69,620; 79,390; 125,809;  
132,045; 142,458; 153,106; 167,089; 202,192.

Hmotové spektrum bolo namerané pri energii elektrónu 70 eV a teplote 130 °C. V hmotovom spektre vykazuje metabolit nasledujúcu fragmentáciu (m/e); relatívna intenzita, (%):

279 (9), 244 (16), 170 (12), 167 (17), 156 (14), 155 (12), 154 (92), 153 (15), 149 (40), 126 (9), 125 (38), 124 (11), 120 (9), 113 (12), 112 (10), 101 (18), 98 (14), 97 (13), 96 (9), 95 (12), 91 (18), 86 (29), 85 (13), 84 (9), 83 (18), 81 (10), 78 (10),

77 (8), 73 (11), 72 (16), 71 (27), 70 (7), 69 (31), 68 (13), 67 (11), 61 (8), 60 (15), 59 (42), 58 (19), 57 (39), 56 (23), 55 (32), 45 (12), 44 (77), 43 (100), 42 (21), 41 (54), 40 (9), 39 (23), 31 (13), 30 (13), 29 (27).

V hmotovom spektre pre vyššie m/e ako 280 nebola už fragmentácia korektná. Meraná látka nedávala molekulový ión.

#### Príklad 6

Postup izolácie bol rovnaký ako je uvedené v príklade 4, avšak ako extrakčné činidlo sa použil dichlórmetán.

#### PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob prípravy metabolitu s protinádorovými účinkami biotransformáciou withaferinu A pomocou mikroorganizmu *Cunninghamella elegans* NRRL 1393, vyznačený tým, že do tekutého média obsahujúceho zdroj uhlíka, organického dusíka a minerálne soli sa naočkuje kultúra vyššie uvedeného mikroorganizmu, pridá naraz alebo po častiach 10 až 200 mg na 100 ml pôdy withaferinu A rozpusteného v polárnom rozpúšťadle, s výhodou v dimetylformamide, pri teplote 26 až 36 °C za stáleho miešania a prevzdušovania sa kultivuje 96 až 168 hodín, ďalej sa filtrát fermentovanej pôdy ex-

trahuje estermi kyseliny octovej, s výhodou octanom etylnatým, a extrakt sa odparí do sucha, prečistí na stĺpci silikagélu s použitím elučného činidla octanu etylnatého, eluát sa zahustí pri teplote 40 °C a kryštalizuje sa pri teplote 4 °C.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačený tým, že sa filtrát fermentovanej pôdy extrahuje chlorovanými uhľovodíkmi s 1 až 5 atómami uhlíka, s výhodou dichlórmetánom.

3. Spôsob podľa bodov 1 a 2, vyznačený tým, že pevný metabolit sa rekryštalizuje, s výhodou zo zmesi octanu etylnatého a acetónu.