



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239 884

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 27 02 84
(21) PV 1349-84

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 13 06 85
(45) Vydáno 01 07 87

(75)
Autor vynálezu

MALINKA ZDENĚK RNDr., OPAVA;
HARAZIM PAVEL ing., KOBEŘICE;
KRAJÍČEK ALOIS PhMr.;
SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA;
STUCHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ

(54)

Nový průmyslový kmen mikroorganismu druhu
Claviceps purpurea (Fr.) TUL. CCM F-734

Účelem řešení je zlepšení surovinové základny pro výrobu preparátů s léčebným účinkem, složených z klasických námelových alkaloidů ergotoxinové skupiny a pro výrobu polosyntetických léčebných preparátů. Jako surovinová základna slouží sklerocia tohoto kmene, obsahující námelové alkaloidy. Uvedeného účinku se dosáhne použitím sklerocií nového průmyslového kmene mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-734, která obsahují námelové alkaloidy v množství 0,32 až 0,93 % (průmyslový obsah 0,51 %) při příslušných výrobcích. Ve sklerociích je minimálně 91,5 % sumy alkaloidů tvořeno ergokorninem, alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem s průměrným vzájemným poměrem 3,3 : 2,1 : 1. Nový průmyslový kmen se dále vyznačuje schopností poskytovat při parazitickém růstu na žitě za užití recentní agrotechniky velmi vysoké hektarové výnosy sklerocií v rozmezí 840 až 1270 kg. Řešení se týká oborů mikrobiologie a farmaceutického průmyslu.

Vynález se týká nového průmyslového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., vyznačujícího se při polní kultivaci na žitě tvorbou námelových sklerocií s vysokým obsahem ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu a schopností dosahovat velmi vysokých hektarových výnosů námele.

Ergokornin, alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin jsou alkaloidy ergotoxinové skupiny a jsou významnými léčivými substancemi. Mohou být použity i jako výchozí látky pro přípravu polosyntetických derivátů námelových alkaloidů s rozšířeným spektrem účinků. Strukturu námelových alkaloidů alfa-ergokryptinu a ergokorninu popsali poprvé Stoll a Hofmann (Helv. Chim. Acta 26, 1570, 1943), strukturu beta-ergokryptinu popsal poprvé Schlientz se sp. (Experientia 23, 991, 1967).

V současné době jsou v terapeutické praxi používány lékové formy směsi námelových alkaloidů ergokorninu, alfa-ergokryptinu, beta-ergokryptinu a ergokristinu většinou pod obchodním názvem DH-ergotoxin. Tyto lékové formy obsahují ergokornin, alfa-ergokryptin, beta-ergokryptin a ergokristin v přesně definovaném poměru 3 : 2 : 1 : 3. Pro výrobu ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu v průmyslovém měřítku jsou dosud využívány kmeny *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-508 (Strnadová K., Kybal J., autorské osvědčení č. 176 803, 1976), CCM F-672 (Malinka Z., Harazim P., Spáčil J., autorské osvědčení č. 222 150, 1982), CCM F-721 (Malinka Z., Harazim P., Spáčil J., autorské osvědčení č. 225 272, 1983). Dále je vyvinut způsob fermentační přípravy námelových alkaloidů s řízeným poměrem tvorby ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu (Kybal J., Malinka Z., Harazim P., Stuchlík J., Spáčil J., Svoboda E., autorské osvědčení č. 202 613, 1980) a vyšlechtěn kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL. CCM F-725 produkující v saprofytických podmínkách směs ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu

(Strnadová K., Kybal J., Svoboda E., Spáčil J., autorské osvědčení č. 222 391, 1982).

Kmen CCM F-508 se při kultivaci na žitě vyznačuje produkcí sklerocií, která obsahují průměrně 0,424 % sumy alkaloidů, z toho ergokornin a ergokryptinu tvoří 70 až 80 %. Přibližný poměr obsahu ergokorninu, alfa a beta-ergokryptinu je 8 : 5,5 : 1. Při výrobě lékových forem námelových alkaloidů ergotoxinového typu ze sklerocií tohoto kmene je nevýhodou nízký obsah žádoucích alkaloidů, vysoké množství nežádoucích alkaloidů (20-30 % sumy alkaloidů) a zejména velmi nízký obsah beta-ergokryptinu. Další nevýhodou jsou nízké hektarové výnosy a z toho plynoucí vysoká cena námele.

Kmen CCM F-672 se při kultivaci na žitě vyznačuje produkcí velmi čistého alfa-ergokryptinu. Při výrobě lékových forem námelových alkaloidů ergotoxinové skupiny z tohoto kmene je nutné přidávat všechny ostatní složky a pracně nastavovat požadovaný poměr. Pro vysokou čistotu alfa-ergokryptinu ve sklerociích tohoto kmene je ekonomicky výhodnější použití pro výrobu polosyntetických léčebných preparátů na bázi alfa-ergokryptinu.

Kmen CCM F-721 se při kultivaci na žitě vyznačuje tvorbou námele s vysokým obsahem alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu se vzájemným poměrem průměrně 1,15 : 1 a maximálním obsahem nežádoucích doprovodných alkaloidů v celkové sumě 10 %. Při výrobě lékových forem námelových alkaloidů ergotoxinové skupiny z tohoto kmene je nutno přidávat ergokornin a obtížně nastavovat požadovaný přesný poměr složek.

Fermentační způsob výroby ergokorninu, alfa a beta-ergokryptinu podle autorského osvědčení č. 202 613 z roku 1980 a při využití kmene CCM F-725 není dosud ekonomicky přístupný.

Uvedené nedostatky výše zmíněných kmenů námele pro polní produkci a fermentačního způsobu výroby alkaloidů ergotoxinové skupiny odstraňuje do značné míry vynález, jímž je nový kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) TUL., uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod označením CCM F-734. Tento kmen je předmětem tohoto vynálezu.

Hlavní výhodou nového kmene je při kultivaci na žitě vyso-

ká produkce sumy alkaloidů ve sklerociích, která dosahuje průměru 0,51 % sušiny biomasy, velmi nízká tvorba nežádoucích doprovodných alkaloidů, které tvoří průměrně 6 % sumy alkaloidů a vysoká tvorba žádoucích alkaloidů ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu (průměr 94 % sumy) ve velmi příznivém poměru průměrně 3,3 : 2,1 : 1. Další výhodou nového kmene je vysoká schopnost infikovat hostitelskou rostlinu, která umožňuje při recentně užívané agrotechnice pěstování námele dosahovat průměrného hektarového výnosu námellových sklerocií 982 kg. Tyto vlastnosti kmene umožňují při polním pěstování získat sklerocia, která představují velmi výhodnou surovinu pro farmaceutickou výrobu. V důsledku vysokých hektarových výnosů je pořizovací cena tohoto námele nižší, než cena dosud užívaných kmenů námele. Použití této suroviny umožní zefektivnit postupy extrakce a izolace při výrobě produktů ergotoxinového typu, zejména snížením spotřeby surovin, snížením počtu technologických operací a pracností. Vlastnosti kmene umožňují rovněž použití jeho sklerocií pro výrobu polosyntetických preparátů.

Popis vlastností nového kmene :

Při saprofytickém růstu na sladidinové půdě ztužené agarem tvoří houba kolonie z typického sfaceliového vzdušného mycelia. Mycelium je poměrně bohatě větvené a postranní hyfy jsou ukončené konidiogenními buňkami. Hojně tvořené konidie mají průměrné rozměry 7 x 3,5 mikrometru. Mladé mycelium je téměř bílé, starší kultury mají střední růžovo-fialovou pigmentaci. Při parazitickém růstu na žitě tvoří houba středně tmavá, hnědo-fialově pigmentovaná sklerocia. Na diploidním fertilním žitě je průměrná hmotnost sklerocií 0,106 g. Sklerocia tohoto kmene, vyrostlá na žitě, obsahují námellové alkaloidy v množství od 0,32 do 0,93 % sušiny biomasy při průměrném obsahu 0,51 %. Minimálně 91,5 % sumy alkaloidů je tvořeno ergokorninem, alfa-ergokryptinem a beta-ergokryptinem (průměrně tvoří 94 % sumy). Poměr ergokorninu ku ergokryptinům je 0,95 - 1,6 : 1 (průměr 3,3 : 3,1), poměr alfa-ergokryptinu ku beta-ergokryptinu je 1,6 - 2,7 : 1 (průměr 2,1 : 1). Doprovodné alkaloidy jsou ergometrin, ergokornam a ergokryptamy.

Nový produkční kmen byl vyšlechtěn z původně travního kmene námele, získaného ze třtiny lesní. Sklerocia námele ze třtiny obsahovala průměrně 0,34 % námelových alkaloidů, tvořených ze 64 % směsí ergokorninu, alfa a beta-ergokryptinu, z 19 % ergosinem, zbývajících 17 % tvořily ergokornam, ergokryptamy a ergometrin. Po naočkování tohoto travního námele na žito byla získána sklerocia obsahující 0,38 % alkaloidů, z toho 73 % tvořily ergokornin, alfa-ergokryptin a beta-ergokryptin v poměru 5,3 : 3,6 : 1 ; 12 % tvořil ergosin, 15 % tvořily ergokornam, ergokryptamy a ergometrin. Vybrané sklerocium bylo převedeno do saprofytické kultury a vytvořené konidie byly ozařovány UV zářením. Suspenze konidií byla ozařována zdrojem UV záření s výkonem $15 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ po dobu 280 sekund, kdy přežívalo 0,15 % konidií. Po ozařování byla suspenze monokonidiově rozizolována. Celý postup UV-mutagenese a izolace byl opakován třikrát. Potom byly kultury z jednotlivých monokonidiových izolátů naočkovány na žito a vzniklá sklerocia byla jednotlivě analyzována. Z těchto sklerocií bylo pro další šlechtění vybráno sklerocium s obsahem alkaloidů 0,41 %, z toho 93 % tvořily ergokornin, alfa a beta-ergokryptin v poměru 4,2 : 2,6 : 1; 7 % tvořily ergokornam, ergokryptamy a ergometrin. Suspenze konidií, vykultivovaných z tohoto sklerocia, byla ozařována UV zářením a postup ozařování kombinovaný monokonidiovou izolací byl opakován dvakrát. Kultury z monokonidiových izolátů byly naočkovány na žito. Na základě analýzy sklerocií získaných z těchto izolátů a infekceschopnosti kultur byl vybrán kmen, který se vyznačuje velmi dobrým spektrem alkaloidů, minimem doprovodných nežádoucích alkaloidů a dlouhodobou stabilitou těchto vlastností. Při růstu na hostitelské rostlině při recentně užívané agrotechnice se tento kmen vyznačuje velmi vysokými hektarovými výnosy sklerocií. Stabilita těchto vlastností byla potvrzena opakovaným pěstováním na žitě ve 4 vegetačních obdobích. Tento kmen je předmětem vynálezu.

Způsob kultivace nového kmene pro získání výchozí suroviny k izolaci ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu a následné výrobě finálních produktů z těchto alkaloidů, i pro získání výchozí suroviny k extrakci sumy alkaloidů a následné výrobě polosyntetických preparátů, je doložen v příkladě použi-

tí, aniž by se tímto příkladem jakkoli omezovaly vlastnosti nového kmene, způsob jeho kultivace a použití.

Příklad použití:

Z potřebného objemu saprofytické kultury kmene se připraví vodná suspenze konidií. Příslušně naředěnou suspenzí konidií se pomocí očkovacího stroje naočkují klasy žita ve fázi metání na ploše 1 ha. Pro naočkování této plochy se použije minimálně $5 \cdot 10^{11}$ konidií. Po 35-60 denním růstu na žitě s chemicky vyvolanou samčí sterilitou se provede sběr narostlých sklerocií námele. Z jednoho hektaru žita bylo získáno 1 066 kg suchých sklerocií námele tohoto kmene, obsahujících 0,51 % sumy alkaloidů, ze které bylo 94 % tvořeno ergokorninem, alfa a beta-ergokryptinem ve vzájemném poměru 3,3 : 2,1 : 1. Získaná droga byla vyextrahována, extrakty z části izolovány na jednotlivé alkaloidy a použity pro výrobu ergotoxinu, z části použity pro výrobu polosyntetických preparátů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

239 884

Nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* /Fr./ TUL. CCM F - 734, vytvářející v polní kultuře na žitě sklerocia v minimálním množství 840 kg/ha, s obsahem sumy alkaloidů nejméně 0,32 % vztaženo na sušinu biomasy, s obsahem ergokorninu, alfa-ergokryptinu a beta-ergokryptinu nejméně 91,5 % sumy alkaloidů a se vzájemným poměrem ergokorninu ku ergokryptinům minimálně 0,95 : 1 a poměrem alfa- ergokryptinu ku beta-ergokryptinu minimálně 1,6 : 1.