(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

ROMÂNIA

(11) **RO 128512 B1**

(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01);
C12N 1/38 (2006.01);
C12N 15/00 (2006.01)

(12) # BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01301**

(22) Data de depozit: **05.12.2011**

(45) Data publicării menţiunii acordării brevetului: **30.12.2014** BOPI nr. **12/2014**

(41) Data publicării cererii:
28.06.2013 BOPI nr. **6/2013**

(73) Titular:
- **INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE IAŞI**, ***FILIALĂ A INCDSB BUCUREŞTI***, *STR.LASCĂR CATARGI NR.47, IAŞI, IS, RO;*
- **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE "GRIGORE T. POPA" DIN IAŞI**, *STR. UNIVERSITĂŢII NR.16, IAŞI, IS, RO;*
- **UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAŞI**, *BD.CAROL I NR.11, IAŞI, IS, RO;*
- **UNIVERSITATEA DE ŞTIINŢE AGRICOLE ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAŞI**, *ALEEA MIHAIL SADOVEANU NR.3, IAŞI, IS, RO*

(72) Inventatori:
- **ROŞU CRĂIŢA MARIA**, *STR.PĂCURARI NR.18, BL.3, SC.D, ET.1, AP.4, IAŞI, IS, RO;*
- **ROTINBERG PINCU**, *STR.ION CREANGĂ NR.73, BL.J 3, SC.B, ET.2, AP.9, IAŞI, IS, RO;*
- **OLTEANU ZENOVIA**, *SPLAI BAHLUI NR.29, BL.5, ET.3, AP.14, IAŞI, IS, RO;*
- **SURDU ŞTEFANIA**, *STR.DECEBAL NR.25, BL.Z 11, SC.B, ET.3, AP.12, IAŞI, IS, RO;*
- **TRUŢĂ ELENA**, *STR.ARCU NR.27, BL.L 19, AP.19, IAŞI, IS, RO;*
- **MIHAI COSMIN TEODOR**, *STR.PĂCURARI NR.128, BL.586, SC.A, ET.2, AP.8, IAŞI, IS, RO;*
- **HRITCU LUMINIŢA**, *STR.CODRESCU TEODOR NR.7C, BL.B 3, SC.B, ET.4, AP.10, IAŞI, IS, RO;*
- **GHERGHEL DANIELA**, *BD.SOCOLA NR.22, BL.T 1, AP.29, IAŞI, IS, RO;*
- **HĂNCIANU MONICA**, *STR.PROF. EMIL HONORIU NR.16 D, IAŞI, IS, RO;*
- **MIRON ANCA**, *ALEEA DOMENII NR.23, IAŞI, IS, RO;*
- **APROTOSOAIE ANA CLARA**, *ŞOS.NAŢIONALĂ NR.76, BL.C 4, SC.A, ET.3, AP.3, IAŞI, IS, RO;*
- **CIOANCA OANA**, *STR.PROF. EMIL HONORIU NR.6, IAŞI, IS, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4618581 (A); BETTINA KOPP ŞI H. J. REHM, "ALKALOID PRODUCTION BY IMMOBILIZED MYCELIA OF CLAVICEPS PURPUREA", EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED MICROBYOLOGY A BIOTECHNOLOGY", VOLUME 18, ISSUE 5, PP 257 - 263, 1983

(54) # PROCEDEU DE OBŢINERE A UNUI PREPARAT DE TIP CLAVINIC ŞI PRODUSUL OBŢINUT PRIN ACEST PROCEDEU

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**

Orice persoană are dreptul să formuleze în scris şi motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenţie, în termen de 6 luni de la publicarea menţiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 128512 B1

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui preparat tip clavinic (agroclavina), prin cultivarea submersă a tulpinii de *Claviceps purpurea* şi preparatul tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar.

Sunt cunoscute speciile genului *Claviceps spp.* (Fr.) Tul. *(Hypocreaceae)* ce produc diferite tipuri de alcaloizi ergotici (în principal de tip ergolinic), care au un spectru larg de activități biologice. Agroclavina, alcaloid de tip clavinic (derivați ai dimetilergolinelor), este unul dintre produşii cu proprietăți agoniste D_1 dopaminei şi α_1-adrenoceptorilor (BERDE, 1984, cf. STAREC el al., 2001), de intensificare a activității celulelor NK (natural killer) şi producției de IL-2 (interleukină) şi γ-interferon până la concentrații de $10^{-7}...10^{-8}$M (FISEROVA et al., 1997, Starek et al., 2001) şi cu efect vasoconstrictor (Eich et. al, 1984).

Agroclavina, festuclavina şi unii dintre derivații lor sintetici sunt evidențiați doar experimental cu efecte antineoplazice, nefiind cunoscute până în prezent produse farmaceutice. De asemenea, activitatea antineoplazică a agroclavinei este comparabilă cu cea a citostaticelor utilizate în clinici, de tipul bleomicinei, adriamicinei şi daunomicinei (EICH et al., 1986; KREN et al., 1997). Clavinele active cauzează „creşterea neechilibrată", o proprietate pe care o împarte cu alți agenți citostatici care acționează selectiv, prin inhibarea sintezei ADN-ului, deci a unei interferențe cu starea de organizare a reticulumului nuclear (Eich et al., 1986).

Mecanismul de acțiune este considerat ca unul fundamental nou pentru compuşii ergolinici, fapt important pentru crearea de noi medicamente.

Dezavantajele produselor de sinteză sau semisinteză constau în asigurarea doar a unei remisiuni temporare a tumorilor, şi au grade diferite de toxicitate pentru organism, cu efecte secundare la nivelul sistemului hematopoietic şi a aparatului digestiv, de tipul: leucopenie, trombocitopenie, creşterea semnificativă a enzimelor hepatice, hipogammaglobulinemia (Methotrexat), supresia măduvei osoase (Chlorambucil), neutropenie (Cyclophosphamid), scăderea numărului de leucocite sau de plachete (Vincristin), trombocitopenie, anemie, cu reducerea clearance-ului creatininei; hipomagnezinemie, hipocalcemie, hipopotasemie; creşterea tranzitorie a transaminazelor serice (Cisplatin), la care se adaugă numeroase reacții adverse.

Pentru producerea la scară industrială a compuşilor clavinici de interes farmaceutic şi medical, se utilizează în special tulpini de *Claviceps fusiformis, Claviceps paspali* şi *Claviceps purpurea.*

Sunt cunoscute (Z. Rehacek, 1978) procedee de cultivare industrială a unor tulpini mutante de *Claviceps purpurea* CP 7/5 CCM F-630 (brevet **CS 204301**), CP7/63 CCM F-631 (brevet **CS 204302**) şi CP7/274 CCM F-632 (brevet **204303**) producătoare de agroclavină şi elimoclavină (predominant). Trin M (brevet **US 4618581**/1986) stabileşte condițiile de cultivare submersă a tulpinii de *Claviceps fusiformis* nr. 00211, pentru obținerea elimoclavinei, utilizată în tratamentul bolii Parkinson şi ca inhibitor a secreției de prolactină (B. Berde şi O. Schild: *Ergot alkaloids and related compounds*; Handb. Exp. Pharm., 49, SpringerVerlag, Berlin, 1978).

Aceste brevete au în comun doar biosinteza alcaloizilor clavinici de către specii ale genului *Claviceps* spp., printr-un proces de fermentație, în condiții aerobe, *p*H =5,5 şi temperatura de 24°C, sursele nutritive şi precursorii variind în funcție de alcaloidul urmărit, nefiind însă orientate către prin obținerea unui produs agroclavinic de uz farmaceutic.

Procesul de extracție, la nivel industrial, a alcaloizilor ergotici, din cultura fungică, presupune protocoale de lucru care au în comun utilizarea aceloraşi grupe de solvenți, cum ar fi: dietil - eter (**CS 264880**, **CS 264881**), cloroform - alcool izopropilic (**US 4618581, US 3884762**), etanol sau metanol (**DP 47315**, **DP 697760**) etc. Dezavantajul utilizării unora dintre ei constă fie în toxicitatea (dietil-eter), fie în lipsa de selectivitate în extracția alcaloizilor clavinici.

Bettina Kopp, H. J. Rehm, Eur J Microbiol Biotechnol, *Alkaloid production by immobilized mycelia of Claviceps purpurea,* 1983, Volume 18, Issue 5, pp. 257-263, descrie un miceliu de *Claviceps purpurea* CBS 164.59 care produce alcaloizi clavinici şi ergometrinici imobilizaţi în diferite matrice. Aceste micelii au prezentat o sensibilitate ridicată la tratamentul fizic şi chimic extrem, şi numai o imobilizare moderată în alginat de calciu, şi s-au dovedit a fi metoda potrivită pentru a produce cantităţi mari de alcaloizi.

Problema pe care o rezolvă invenţia este un procedeu de obţinere a unui biopreparat de natura clavinică, cu origine în tulpina de *Claviceps purpurea,* ca produs natural, cu efect antitumoral şi de uz veterinar.

Procedeul de obţinere a unui preparat tip clavinic cu acţiune antitumorală, de uz veterinar, înlătură dezavantajele soluţiilor cunoscute prin aceea că o tulpină de *Claviceps purpurea* de tip alcaloidic clavinic, nepigmentată şi nesporulată, se cultivă pe un mediu de fermentaţie slab aerat, care conţine zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu şi extract de drojdie, miceliul liofilizat se extrage cu apă, extractul obţinut se extrage, în continuare, cu hexan, pentru îndepărtarea lipidelor, iar extractul micelar rămas se alcalinizează la *p*H=9 cu NH_4OH, şi se supune extracţiei în trei etape succesive în cloroform, ceea ce asigură o extracţie selectivă a alcaloidului clavinic care se concentrează la sec, rezultând un reziduu uscat de culoare gălbuie, cu aspect onctuos şi miros înţepător, care se diluează în DSMO la o concentraţie de 0,250 mg alcaloid clavinic/ml şi se păstrează la 4...5°C, în flacoane de culoare închisă.

Preparatul cu acţiune antitumorală, de uz veterinar, înlătură dezavantajele soluţiilor cunoscute prin aceea că este obţinut prin procedeul definit mai sus, sub forma unui solid de culoare gălbuie, cu aspect onctuos şi miros înţepător.

Prin aplicarea invenţiei se obţin următoarele avantaje:

- eficienţă în doze mici (50 µg/kg corp) şi
- toxicitate redusă.

Procedeul de obţinere a unui preparat tip clavulanic cu acţiune antitumorală, de uz veterinar, porneşte de la o tulpină de *Claviceps purpurea,* crescută pe mediu solid T2, la 28°C, timp de 21 de zile, cultivată în flacoane Erlenmeyer de 500 ml, cu 100 ml mediu SC100 pentru obţinerea inoculului în două faze (2+4 zile), la 24°C şi 200 rot/min pe agitator rotativ, inoculul obţinut fiind transferat în 7 l mediu de fermentaţie, într-un bioreactor în procent de 1% biomasă umedă/l mediu de fermentaţie CS2 (în 3 variante adaptate după Pazoutova, 1981), parametrii de proces fiind setaţi la 200 rot/min, 24°C, aerare de 1 şi 0,5 vvm (volum aer/volum mediu/min) şi presiunea O_2 variabilă, biomasa rezultată după 7 zile de fermentaţie fiind recoltată, filtrată, spălată cu apă distilată şi liofilizată, producţia maximă fiind de 35 g miceliu liofilizat/l cultură, conţinut alcaloidic total de 96,14 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv, de 3,17mg mg/100 ml lichid de cultură.

Produsul clavinic (concentraţie maximă de 4,1530 mg agroclavină/100 mg fracţiune extractivă) este obţinut prin extracţia apoasă a miceliului liofilizat în raport de 1:10, extractul apos fiind ulterior supus delipidării cu hexan, faza hexanică este îndepărtată, iar extractul micelian delipidat este alcalinizat la *p*H=9,0 cu hidroxid de amoniu 25%, extras ulterior de 3 ori succesiv cu cloroform, faza organică este separată, concentrată la sec sub presiune redusă, la 35°C, iar produsul final este obţinut prin resolvirea fracţiei uscate în DMSO, concentraţia este ajustată la 250 µg/ml şi este păstrat la întuneric şi la temperatura de 4...8°C.

În continuare se prezintă 3 exemple de obţinere a produsului în 3 variante de mediu de cultură diferite, în legătură cu fig. 1...6 şi tabelele 1...5, ce reprezintă:

- fig. 1, cromatograma HPLC a amestecului de substanţe etalon;

- fig. 2, spectrele de absorbție ale substanțelor etalon în domeniul 200...400 nm (A - acidul ergocorninei; B - agroclavină ; C - ergocriptină; D - ergocristină);
- fig. 3, formula de calcul pentru cuantificarea componentului din probă;
- fig. 4, puritatea peak-ului corespunzător probei F1 (raportul spectral detaliat: semnalul înregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.098 - stânga jos; puritatea şi simetria peak-ului - dreapta jos);
- fig. 5, puritatea peak-ului corespunzător probei F2 (raportul spectral detaliat: semnalul înregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.098 - stânga jos; puritatea şi simetria peak-ului - dreapta jos);
- fig. 6, puritatea peak-ului corespunzător probei F3 (raportul spectral detaliat: semnalul înregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.019 - stânga jos; puritatea şi simetria peak-ului - dreapta jos).

Tabelul 1. Medii de cultură utilizate şi condiții de incubare pentru cultivarea ciupercii *Claviceps purpurea*.

Tabelul 2. Caracterizarea culturii fungale rezultate din fermentația submersă timp de 7 zile a tulpinii de *Claviceps purpurea*.

Tabelul 3. Timpii de retenție obținuți pentru soluțiile etalon.

Tabelul 4. Timpii de retenție obținuți pentru probe.

Tabelul 5 - Caracterizarea produsului (fracțiuni alcaloid-clavinice rezultate din extracția cloroformică a preparatelor apoase brute obținute din 4 g miceliu liofilizat).

Exemplul 1

Tulpina de *Claviceps purpurea,* crescută pe mediu solid T2, la 28°C, în vârstă de 21 de zile, este cultivată în flacoane Erlenmeyer de 500 ml cu 100 ml mediu SC100, pentru obținerea inoculului în două faze (2+4 zile), la 24°C şi 200 rot/min, pe agitator rotativ.

Inoculul obținut este transferat în 7 l mediu de fermentație, în bioreactor, în procent de 1% biomasă umedă/l mediu de fermentație CS2 sterilizat în prealabil la 121°C/30 min, procesul fiind setat la 200 rot/min, 24°C, aerare de 1 vvm (1 volum aer/volum mediu/min) şi presiune a O_2 variabilă.

După 7 zile de fermentație cultura este filtrată, miceliul spălat cu apă distilată şi liofilizat (proba F1), în miceliul liofilizat şi lichidul de cultură fiind determinat conținutul alcaloidic total (mg%), după metoda van Urk (Rumpell, 1955), producția obținută fiind de 16 g miceliu liofilizat/l cultură, conținut alcaloidic total de 23,46 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv, de 2,47 mg/100 ml lichid de cultură.

Ulterior se realizează extracția apoasă a unei părți din miceliul liofilizat în raport de 1:10 (4 g miceliu:40 ml apă distilată), prin mojararea uscată a acestuia, urmată de două spălări consecutive a resturilor celulare cu apă distilată. Extractul obținut este supus extracției şi purificării ulterioare, 40 ml extract micelian este delipidat în pâlnia de separare cu 40 ml hexan. Faza hexanică este îndepărtată, iar extractul micelian delipidat este alcalinizat la *p*H=9,0 cu hidroxid de amoniu 25% sub uşoară agitare. Prin alcalinizare, alcaloizii prezenți în extract sub formă de săruri sunt trecuți în bazele corespunzătoare, extractibile în solvenți organici nepolari. Extractul alcalinizat este ulterior extras de 3 ori succesiv cu câte 40 ml cloroform, în pâlnia de separare. Prezența alcaloizilor de tip agroclavină este controlată prin determinarea spectrului fazei organice, în domeniul 200...400, şi măsurarea absorbanței probei la 282 nm față de cloroform. Faza organică (97 ml) este separată şi concentrată la sec sub presiune redusă la 35°C. Se obțin 25 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect onctuos, miros înțepător, neplăcut).

Determinarea calitativă şi semicantitativă a conținutului alcaloidic, în scopul identificării componentei cu activitate antineoplazică, se face prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), cu fază inversă, în următoarele condiții: *Sistem HPLC:* Agilent 1200, cu înregistrarea şi integrarea cromatogramelor prin sistemul computerizat Borwin şi

detector şir de diode; Faza staţionară: Micropak Amino (250 mm x 2,1 mm; 10 µm); Temperatura coloanei: menţinută constant la 20°C; Faza mobilă: *componenta A* = eter; *componenta B* = etanol, în proporţie de 80:20 izocrat; Debit: 0,15 ml/min; Volumul injectat: 20 µl soluţii de analizat, respectiv, standard; Detecţie: UV la cinci lungimi de undă diferite (A = 225, 240, 254, 282 şi 310 nm), pentru probe şi etaloane. Suplimentar pentru fiecare etalon se înregistrează spectrul de absorbţie în intervalul A = 200...400 nm, care sunt folosite pentru comparaţia cu spectrele picurilor corespunzătoare, separate din cromatogramele probelor analizate. Pentru identificarea alcaloizilor (agroclavină şi, posibil, prezenţa ergotoxinelor), se utilizează ca etaloane agroclavina, ergocristina, ergocornina şi ergocriptina (100,4 µg/ml - LGC Standards, Wesel, Germania). Identificarea picurilor se realizează atât prin comparaţia timpilor de retenţie din cromatograma probei cu cei ai etaloanelor, cât şi prin compararea spectrelor de absorbţie pentru peak-urile obţinute cu cele ale etaloanelor analizate în aceleaşi condiţii cromatografice.

După optimizarea condiţiilor de lucru cromatografice în vederea separării, se injectează soluţiile etalon şi se determină timpii de retenţie pentru aceşti compuşi. Pentru etaloane se înregistrează şi spectrele de absorbţie în UV-VIS, şi cromatogramele sunt folosite, în continuare, pentru identificarea aceloraşi compuşi în diversele probe. Identificarea şi compararea spectrelor probelor cu cel al etalonului s-au făcut la aceeaşi lungime de undă, 282 nm, care, conform datelor din literatură, este lungimea la care agroclavina prezintă maximul de absorbţie.

Pentru agroclavina standard, la analiza HPLC se înregistrează 2 peak-uri corespunzătoare celor 2 stereoizomeri acceptaţi: agroclavina (TR 12.075) şi agroclavina 1 (TR. 14.649). În proba analizată s-a identificat un singur compus, agroclavina. Peak-ul din proba F1 (TR. 12.040) corespunde agroclavinei standard cu TR 12.075, având şi un spectru comparabil cu cel al acesteia.

După ce identificarea compusului este confirmată după timpul de retenţie, dar şi spectral, pentru peak-ul obţinut se efectuează calcularea purităţii peak-ului. În cadrul analizei cromatografice de lichide de înaltă performanţă se urmăreşte ca peak-urile obţinute să fie cât mai pure, astfel încât identificarea să fie realizată cu precizie. În acest scop, se selectează parametrii metodei pentru ca fiecărui component să îi corespundă un peak bine definit şi simetric. În cadrul analizei noastre în probe s-a identificat un singur compus, după cum am menţionat deja, parametrii aleşi permiţând obţinerea unor peak-uri simetrice. Totodată, puritatea acestora a depăşit limita minimă admisă. Simetria şi puritatea permit obţinerea unui spectru clar, care poate fi comparat cu uşurinţă cu cel al etalonului, astfel încât identificarea să fie sigură. Factorul de puritate al peak-ului de la minutul 12.040, identificat ca fiind agroclavină, are valoarea de 997,743 (din maximum 1000), toate punctele din spectru luate în calcul (541 din 541) fiind simetrice. Utilizând standardul cu agroclavina de concentraţie cunoscută, se cuantifică 2,6148 mg agroclavină % mg fracţiune uscată, ceea ce corespunde la 16,34 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat (69,65% din conţinutul alcaloidic total al miceliului). Pentru obţinerea preparatelor clavinice în vederea testării *in vitro,* reziduul sec este resolvit în DMSO concentrat (10 mg reziduu sec în 0,2 g DMSO), concentraţia ajustată la 250 µg/ml şi păstrat la 4...8°C, în flacoane brune.

Testarea *in vitro* a proprietăţii citostatice a produsului clavinic pe culturi de celule neoplazice umane HeLa şi HEp-2p este realizată pe modele experimentale adecvate, care permit (prin metode biochimice şi citometrice) evidenţierea şi dovedirea reproductibilităţii efectului proteinosintezo- şi mitoinhibitor, de inhibare a dezvoltării culturilor celulare la doza citostatic activă, EC_{50}, de 5 µg/ml, stabilirea dependenţei eficienţei farmacodinamice de doza de tratament - ce permite optimizarea limitată a eficienţei prin manipularea experimentală a dozelor de tratament.

S-a dovedit că produsul clavinic are, pe lângă efectul citostatic de inhibare a diverselor procese celulare, şi un impact citotoxic, inferior ca intensitate efectului citostatic indus, corelat direct proporţional cu doza agentului bioactiv.

Exemplul 2

Tulpina de *Claviceps purpurea,* cultivată pe mediu solid T2, timp de 21 de zile, la 28°C, este utilizată pentru prepararea inoculului, în condiţiile prezentate la exemplul 1. Cu inoculul obţinut se însămânţează (1% biomasă umedă/l mediu de fermentaţie) 7 l mediu de fermentaţie CS2, adaptat pentru stimularea biosintezei agroclavinei prin creşterea cantităţii de zaharoză la 200g/l (mediu sterilizat anterior la 121°C/30 min) şi adăugarea extractului de drojdii 1% (sterilizat separat) după 3 zile de la debutul fermentaţiei, de asemenea, în scopul stimulării biosintezei nucleului ergolinic, dar şi al cantităţii totale de biomasă fungică. Condiţiile de fermentaţie în bioreactor au fost setate la 200 rot/min, 24°C, aerare de 0,5 vvm (0,5 volum aer/volum mediu/min) şi presiune a O_2 variabilă.

După 7 zile de fermentaţie cultura este filtrată şi materialul biologic (proba F2) este pregătit în conformitate cu protocolul de la exemplul 1. În condiţiile date, se obţin 30 g miceliu liofilizat/l cultură, conţinut alcaloidic total de 52,75 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv, de 3,68 mg/100 ml lichid de cultură.

Extracţia şi purificarea alcaloizilor clavinici se realizează după protocolul de la exemplul 1. În aceste condiţii, se obţin 40,8 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect onctuos, miros înţepător, neplăcut). Prin analiza HPLC, în cromatograma fracţiei analizate se evidenţiază numai un compus cu timp de retenţie (min) de 12.098. Peak-ul din probă corespunde agroclavinei (etalon: TR 12.075), având un spectru comparabil cu al acesteia. Factorul de puritate al peak-ului de la minutul 12.098, identificat ca fiind agroclavina, are valoarea de 997,218. Agroclavina este ulterior cuantificată la 4,1344 mg agroclavină % mg fracţiune uscată, ceea ce corespunde la 42,17 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat (79,94% din conţinutul alcaloidic total al miceliului). Obţinerea preparatelor clavinice pentru testarea *in vitro* se realizează după acelaşi protocol ca la exemplul 1, reziduul sec obţinut fiind reluat direct în DMSO (10 mg produs în 0,2 g DMSO), concentraţia este ajustată la 250 µg/ml şi este păstrat la 4...8°C, în flacoane brune. Testarea *in vitro* a produsului clavinic duce la obţinerea de rezultate similare exemplului 1, pentru confirmarea eficacităţii produsului.

Exemplul 3

Tulpina de *Claviceps purpurea,* cultivată pe mediu solid T2 timp de 21 de zile, la 28°C, este utilizată pentru prepararea inoculului, în condiţiile prezentate la exemplul 1. Cu inoculul obţinut se însămânţează 7 l mediu de fermentaţie CS2, adaptat pentru stimularea biosintezei agroclavinei prin creşterea cantităţii de zaharoză la 200g/l, mediu (sterilizat anterior la 121°C/30 min) asociat cu adăugarea extractului de drojdii numai 0,1% de la începutul fermentaţiei. Procesul de fermentaţie în bioreactor este setat la 200 rot/min, 24°C, aerare de 0,5 vvm (0,5 volum aer/volum mediu/min) şi presiune a O_2 variabilă.

După 7 zile de fermentaţie, cultura este filtrată şi materialul biologic (proba F3) este pregătit în conformitate cu protocolul de la exemplul 1. În condiţiile date se obţin 35 g miceliu liofilizat/l cultură, conţinut alcaloidic total de 96,14 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv, de 3,17 mg/100 ml lichid de cultură.

Extracţia şi purificarea alcaloizilor clavinici se realizează după protocolul de la exemplul 1. În aceste condiţii, se obţin 54,4 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect onctuos, miros înţepător, neplăcut). Prin analiza HPLC, în cromatograma fracţiei analizate se evidenţiază numai un compus cu timp de retenţie (min) de 12.019. Peak-ul din probă corespunde agroclavinei (etalon: TR 12.075), având şi un spectru comparabil cu al acesteia. Factorul de puritate al peak-ului de la minutul 12.019, identificat ca fiind agroclavina, are valoarea de 998,693. Agroclavina este ulterior cuantificată la 4,1530 mg, % mg fracţiune uscată de agroclavină, ceea ce corespunde la 56,89 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat

(58,42% din conținutul alcaloidic total al miceliului). Obținerea preparatelor clavinice pentru testarea *in vitro* şi *in vivo* se realizează după acelaşi protocol ca la exemplul 1, reziduul sec obținut fiind reluat în DMSO (în raport de 10 mg produs în 0,2 g DMSO), concentrația ajustată la 250 µg/ml, şi păstrat la 4...8°C, în flacoane brune.

Testarea *in vitro* a produsului clavinic duce la obținerea de rezultate similare ca la exemplul 1, confirmând eficacitatea produsului şi reproductibilitatea experimentului.

Screeningul preclinic *in vivo*, complex şi multietapizat, pe modele experimentale adecvate cercetării farmacodinamice, a efectului antineoplazic al produsului clavinic este realizat pe şobolani albi din rasa Wistar, purtători de tumori transplantabile (carcinosarcom Walker 256 sau epiteliom limfotrop Guerin T-8), în varianta lor solidă, cu dezvoltare subcutanată. Tratamentul zilnic, intraperitoneal al purtătorilor de tumoră Walker şi, respectiv, Guerin T-8 cu produsul clavinic, în doză de 50 µg/kg corp, s-a concretizat prin inducerea unor scăderi, semnificative statistic, ale masei tumorale medii, față de greutatea tumorală medie martor. Aceste încărcături tumorale medii permit estimarea unor valori ale indicilor de evaluare (regresie tumorală medie, valoare T/C) a acțiunii antitumorale *in vivo* semnificative din punct de vedere citostatic (față de valorile minime impuse de programele american şi nemțesc de screening preclinic, elaborate în vederea identificării unor noi posibili agenți antitumorali: GTM de 35% şi valoare T/C de 0,54).

S-a dovedit posibilitatea de optimizare a potențialului tumorosupresor al produsului clavinic, prin manipularea dozelor sale terapeutice, precum şi aprecierea unei semnificative eficiențe oncochimioterapeutice ale acestuia în lumina potențialului antitumoral al metotrexatului, ciclofosfamidei, etopozidului şi 5-fluoruracilului, valorile indicilor de evaluare corespunzătoare noului produs fiind similare celor înregistrate în terapia experimentală cu ciclofosfamidă sau metotrexat, şi chiar superioare celor caracteristice tratamentului cu 5-fluorouracil sau etopozid, în condițiile folosirii unor doze de tratament anticanceros experimental mult inferioare celor caracteristice citostaticelor standard, ceea ce sugerează şi o mai bună tolerabilitate a tratamentului, probabil datorită unei toxicități mai reduse.

Screeningul preclinic *in vivo* este completat de testarea pe animale de companie, cu tumori externe, greu abordabile chirurgical. Produsul este administrat în doze săptămânale de 50 µg/kg masă tumorală (tumori mamare), timp de 10 săptămâni, intratumoral în puncte diferite conduce la reducerea tumorii mamare cu 4,5 cm lungime şi 1,5 cm lățime în primele 5 săptămâni de administrare intratumorală zilnică a produsului clavinic. Prin examenul de necropsie al tumorilor ablate chirurgical se evidențiază modificarea consistenței acestora din dure, la inițierea experimentelor, în moi, la finalul experimentului, iar histopatologic se evidențiază necrozări ale țesutului tumoral şi vacuolizări ale acestuia. Produsul nu are efecte secundare majore sau reacții secundare importante, nefrotoxicitatea şi hepatotoxicitatea fiind aproape nesesizabile.

Conform clasificării Organizației Mondiale a Sănătății a efectelor toxice acute şi subacute ale unui aplicabil tratament chimioterapie în cele cinci grade de toxicitate (gradul 0 - gradul 4) hematologică, considerăm că produsul clavinic se încadrează în grupa 1 de toxicitate, ce cuprinde chimioterapice care modifică astfel cu circa 7% valorile numărului mediu de eritrocite circulante, a hemoglobinemiei şi a hematocritului şi, respectiv, cu circa 13,8% valorile numărului mediu de leucocite circulante (3...3,9 x 10^3/mm^3).

Produsul obținut conform invenției prezintă avantajul potențării acțiunii sale antitumorale, prin manipularea experimentală a dozelor de tratament, îmbunătățirea efectului antineoplazic, prin utilizarea unor doze oncochimioterapeutice mult reduse față de cele ale unor citostatice de uz clinic, şi atenuarea simptomatologiei bolii citostatice, datorită inducerii unor efecte secundare moderate, mai tolerabile de către organismul animal, produsul clavinic dovedind biocompatibilitatea organismului animal cu oncochimioterapia experimentală clavinică, şi buna sa tolerabilitate.

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unui preparat tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, **caracterizat prin aceea că** o tulpină de *Claviceps purpurea* de tip alcaloidic clavinic, nepigmentată şi nesporulată, se cultivă pe un mediu de fermentație slab aerat, care conține zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu şi extract de drojdie, miceliul liofilizat se extrage cu apă, extractul obținut se extrage, în continuare, cu hexan, pentru îndepărtarea lipidelor, iar extractul micelar rămas se alcalinizează la *p*H=9 cu NH_4OH, şi se supune extracției în trei etape succesive în cloroform, ceea ce asigură o extracție selectivă a alcaloidului clavinic care se concentrează la sec, rezultând un reziduu uscat de culoare gălbuie, cu aspect onctuos şi miros înțepător, care se diluează în DSMO la o concentrație de 0,250 mg alcaloid clavinic/ml şi se păstrează la 4...5°C în flacoane de culoare închisă.

2. Procedeu de obținere a preparatului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** respectiva cantitate de zaharoză introdusă creşte de la 100 g/l la 200 g/l, iar cantitatea de extract de drojdii introdusă în cultură este fie în doză de 0,1 g/l, la începutul fermentație, sau în doză de 1 g/l, în ziua a 3-a de fermentație.

3. Preparat tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, obținut prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este obținut sub forma unui solid de culoare gălbuie, cu aspect onctuos şi miros înțepător.

Tabelul 1

Medii de cultură utilizate şi condiţii de incubare pentru cultivarea ciupercii Claviceps purpurea

Nutrienţi	Mediu de întreţinere T2 (g/l)	Mediu inocul SC100 (g/l)	Medii de fermentaţie		
			CS2 (g/l) F1	CS2 (g/l) F2	CS2 (g/l) F3
Zaharoză	100	100	100	200	200
Asparagină	10	-	-	-	-
Acid citric	-	10	16	16	16
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	10	10	10
$CaCl_2$	-	-	1,1	1,1	1,1
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1,0	-	-	-	-
KH_2PO_4	0,250	0,5	0,25	0,25	0,25
$MgSO_4.7H_2O$	0,250	0,3	0,25	0,25	0,25
Extract de drojdii	0,1	-	-	0,1	1,0
NaCl	-	10	-	-	-
KCl	0,12	-	0,12	0,12	0,12
$FeSO_4.7H_2O$	0,02	-	0,02	0,02	0,02
$ZnSO_4 7H_2O$	0,014	-	0,015	0,015	0,015
Agar	20	-	-	-	-
*p*H iniţial	5,2	5,5	5,5	5,5	5,5
Gradul de aeraţie a culturii în fermentaţie			1 vvm	0,5 vvm	0,5 vvm
Temperatura de incubare	28˚C	24˚C	24˚C	24˚C	24˚C
Agitare (rot/min)	-	200	200	200	200

Tabelul 2

Caracterizarea culturii fungale rezultate din fermentaţia submersă timp de 7 zile, a tulpinii de Claviceps purpurea

Proba	Biomasă liofilizată (g/l)	Conţinut alcaloidic total		Lipide (g/100g miceliu liofilizat)	*p*H
		Miceliu liofilizat (mg/100g miceliu liofilizat)	Supernatant mg/100ml)		
F1	16	23,46	2,47	17,66	4,67
F2	30	52,75	3,68	17,11	4,59
F3	35	96,14	3,17	16,42	4,73

Tabelul 3

Timpii de retenţie obţinuţi pentru soluţiile etalon

Nr. crt.	Denumire etalon	Timp de retenţie (min)
1	ergocornină	8.910
2	agroclavină	12.075
3	ergocriptină	13.321
4	ergocristină	13.714
5	agroclavina 1	14.649

Tabelul 4

Timpii de retenție obținuți pentru probe

Nr. crt.	Denumire probă	Timp de retenție (min)
1.	F1	12.040
2.	F2	12.098
3.	F3	12.019

Tabelul 5

Caracterizarea produsului
(fracțiuni alcaloid-clavinice rezultate din extracția cloroformică
a preparatelor apoase brute obținute din 4 g miceliu liofilizat)

Proba	Fracțiune extractivă (mg)	mg agroclavină/ 100 mg fracțiune extractivă	mg agroclavină/ 100 g miceliu liofilizat	Aspect
F1	25,0	2,6148	16,34	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător
F2	40,8	4,1344	42,17	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător
F3	54,8	4,1530	56,89	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător

(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01);
C12N 1/38 (2006.01);
C12N 15/00 (2006.01)

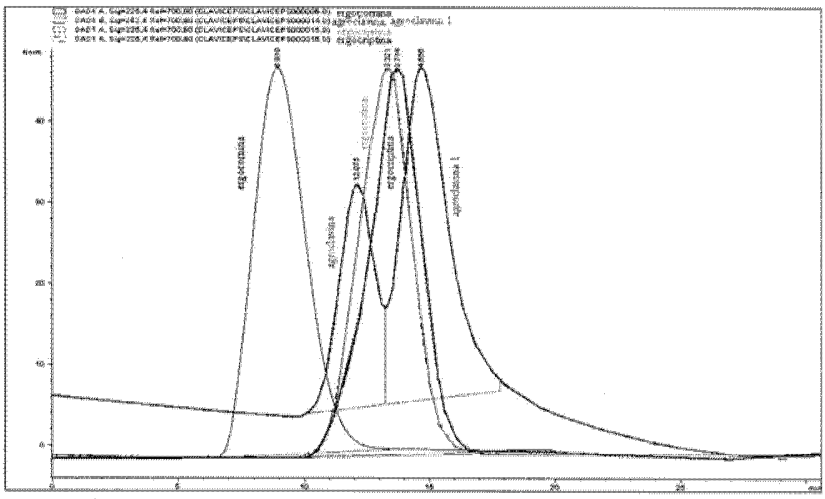

Fig. 1

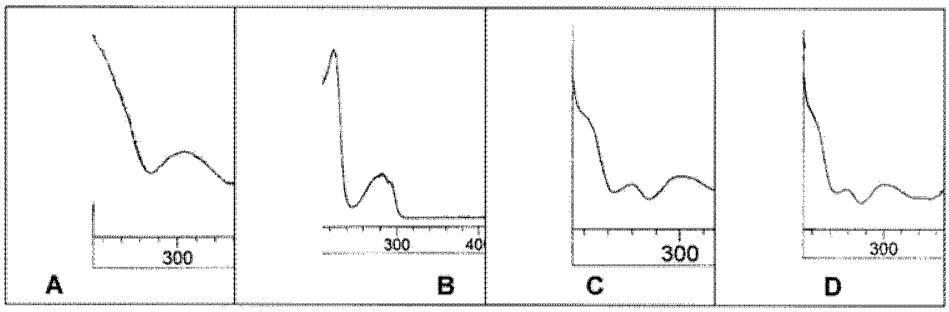

Fig. 2

$$Cp = \frac{Ce \times Ap}{Ae}$$

Fig. 3

(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01);
C12N 1/38 (2006.01);
C12N 15/00 (2006.01)

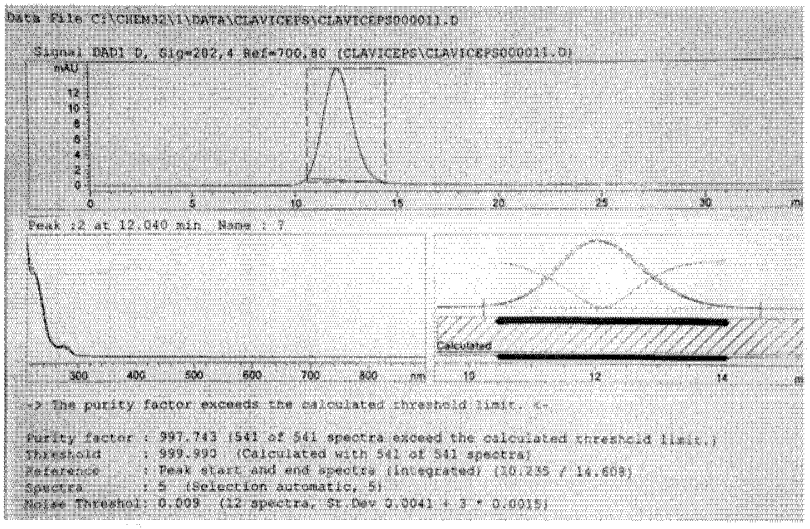

Fig. 4

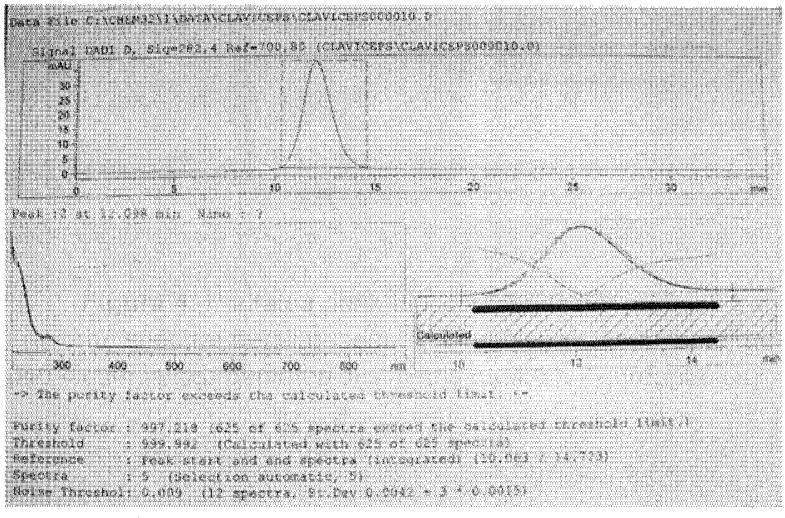

Fig. 5

(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01);
C12N 1/38 (2006.01);
C12N 15/00 (2006.01)

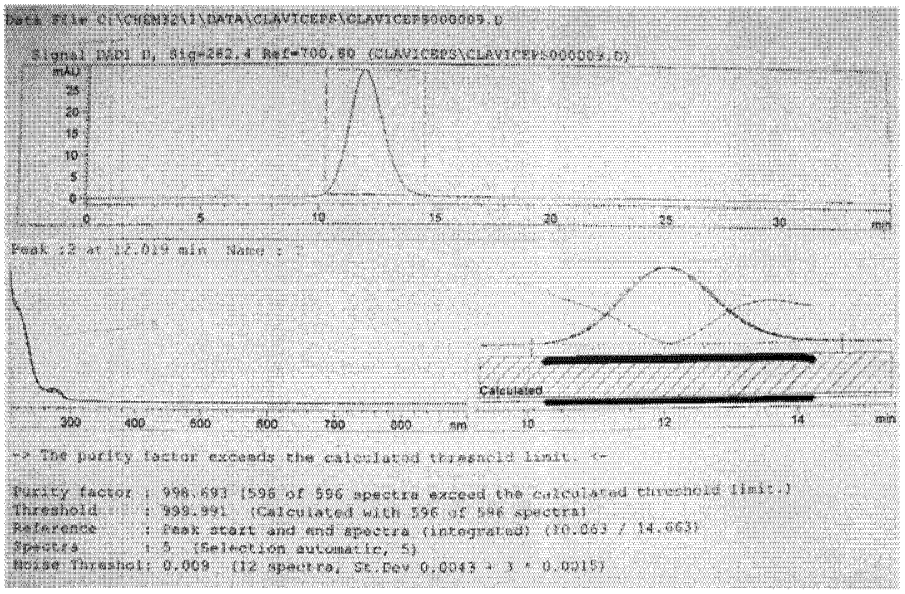

Fig. 6

Editare şi tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenţii şi Mărci
sub comanda nr. 845/2014