

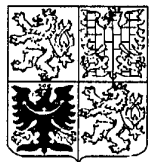
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 877

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2396-91**

(22) Přihlášeno: 01. 08. 91

(40) Zveřejněno: 17. 02. 93

(47) Uděleno: 29. 05. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12. 07. 95

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 12 N 1/14

(73) Majitel patentu:

Galena, a.s., Opava-Komárov, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Považská Hana Pharm. dr., Opava, CZ;

Valík Josef RNDr., Opava, CZ;

Malinka Zdeněk RNDr., Opava, CZ;

Harazim Pavel ing., Kobeřice, CZ;

Spáčil Jiří PhMr., Opava, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Nový průmyslový kmen mikroorganismu
druhu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., CCM
8058**

(57) Anotace:

Účelem řešení je zabezpečení výchozí suroviny pro výrobu námelového alkaloidu ergokristinu a následně kyseliny lysergové a polosyntetických alkaloidů a výroba lékových forem těchto alkaloidů. Surovinou pro tyto výroby jsou námelová sklerocia. Uvedeného účelu se dosáhne vypěstováním sklerocií nového průmyslového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. CCM 8058 parazitní kultivací na žitě a použitím těchto sklerocií k výrobě substancí ergokristinu, kyseliny lysergové a polosyntetických námelových alkaloidů. Sklerocia obsahují minimálně 0,73 % námelových alkaloidů, z nichž je minimálně 80,4 % tvořeno ergokristinem.

CZ 279 877 B6

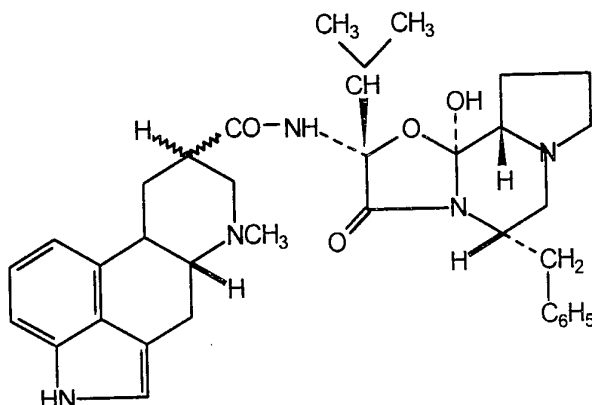
Průmyslový kmen mikroorganismu druhu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., CCM 8058.

Oblast techniky

Vynález se týká průmyslového kmene mikroorganismu určeného k produkci námelového alkaloidu ergokristinu a dalších alkaloidů za podmínek parazitní kultivace na žitě pro potřeby farmaceutického průmyslu.

Dosavadní stav techniky

Ergokristin je námelový alkaloid chemického vzorce:



Izolovali jej a jeho strukturu popsali poprvé Stoll A. a Burckhardt E. (Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 250, 1, 1937). Ergokristin je významnou léčivou substancí. V humánní medicíně je používán buď samostatně, nebo v lékových formách ve směsích s jinými námelovými alkaloidy, ergokryptiny a ergokorninem. Lze jej využít i jako zdroj kyseliny lysergové pro následnou výrobu polosyntetických derivátů námelových alkaloidů, využitelných v humánní i veterinární medicíně. Pro výrobu ergokristinu se používají průmyslové kmeny mikroorganismu *Claviceps purpurea*. Ergokristin lze získávat saprofytní kultivací za podmínek submersní fermentace (Mantle P. G. in Smith J. E., Berry D. R., The Filamentous Fungi, Vol. 1, Arnold, London, 1974; Floss H. G., Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur., 17, 249, 1980; Kobel H., Sanglier J. J. in FEMS Symposium No. 5, 233 1978; Spalla C., Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur., 17, 271, 1980; Udvardy Nagy E., Process Biochem. 15, 5, 1980; BRD pat. 1, 806.984; CH pat. 523.964, přihláška patentu 23. 12. 82-DD-246422 22.08. 84)) nebo parazitní kultivací na žitě, které je hostitelskou rostlinou (Kobel H., Sanglier J.-J. in Rehm H.-J., Reed G., Biotechnology, Vol. 4, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986; Young J. CH., J. Environ. Sci. Health, P.B., 1, 83, 1981; Vasarbely G., Udvardy E., Agrartud. Kozl. 39, 1/2, 324, 1980; Shaw B. J., Mantle P. G., Trans. Brit. mycol. Soc. 75, 77, 1980; Clark B.J. in Parnham M.J., Bruinvels J., Discoveries in Pharmacology, Vol.2, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1984; BRD pat. 3,006.989; belg. pat. 881.864; přihlášky patentu 30. 07. 82-HÚ-002447 (28. 06. 84), 30. 07. 82-HÚ-002446 (28. 06. 84)).

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., CCM 8058 uložený v Československé sbírce mikroorganismů Masarykovy university, Joštova 10, 662 43 Brno, vytvářející v polní kultuře na žitě sklerocia s obsahem sumy alkaloidů minimálně 0,7 % vztaženo na sušinu biomasy a s obsahem ergokristinu minimálně 80,4 % sumy alkaloidů. Tento nový kmen umožňuje zefektivnit extrakční a izolační postupy při výrobě ergokristinu, kyseliny lysergové a polosyntetických derivátů námelových alkaloidů podstatným zvýšením výtěžnosti těchto postupů. Zvýšená výtěžnost je dána velmi vysokým obsahem ergokristinu ve sklerociích nového kmene ve srovnání s ostatními dosud užívanými typy sklerocií. Obsah alkaloidů ve sklerociích nového kmene CCM 8058 dosahuje 0,73 % až 2,66 % sušiny biomasy, přičemž obsah ergokristinu je 0,58 % až 2,14 % sušiny biomasy. Další výhodou nového kmene je schopnost dosahovat velmi vysokých hektarových výnosů, srovnatelných s jinými vysokoprodukčními kmeny *Claviceps purpurea* (například CCM 8057, CCM F-755, CCM F-743). Polní kultivace nového kmene s vysokým obsahem alkaloidů při vysokých hektarových výnosech sklerocií vede k úspoře zemědělské půdy potřebné k vyprodukování stejného množství alkaloidů v porovnání s kultivací kmene CCM F-722 (čs. autorské osvědčení č. 222 145) nebo s využitím stimulace produkce podle CS 277 588. Výhodou je i odlišné zbarvení sklerocií nového kmene oproti sklerociím ostatních průmyslových kmenů *C. purpurea*, které usnadňuje identifikaci drogy nového kmene při veškeré manipulaci.

Popis vlastností nového kmene:

Při saprofytní kultivaci na sladidinovém médiu ztuženém agarem tvoří houba kolonie z typického sfaceliového vzdušného mycelia. Mycelium je bílé, větvené, postranní hyfy jsou ukončeny konidio-
genními buňkami. Konidie mají průměrné rozměry 9 x 5 μm .

Při parazitní kultivaci na žitě tvoří houba zpočátku světlá, béžová, později šedohnědá sklerocia o váze v rozmezí 0,010 až 0,120 g (průměr 0,062 g). Sklerocia obsahují námelové alkaloidy v množství 0,73 až 2,66 % sušiny biomasy při průměrném obsahu 1,26 %. Minimálně 80,4 %, průměrně 82,8 % sumy alkaloidů je tvořeno ergokristinem. Zbytek je tvořen doprovodnými alkaloidy α -ergokryptinem, ergometrinem a klavinovými alkaloidy.

Nový průmyslový kmen CCM 8058 byl vyšlechtěn z původního produkčního kmene CCM F-722. Sklerocium tohoto kmene s obsahem 1,05 % alkaloidů bylo převedeno do saprofytní kultury a vytvořené konidie byly ozařovány UV zářením o výkonu $15 \text{ I m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ po dobu 220 s, kdy přežívalo 0,25 % konidií. Po ozařování byla suspence konidií monosporicky rozizolována. Celý postup UV mutagenese byl opakován 3x. Potom byly kultury z jednotlivých monokonidiových zolátů naočkovány na žito. Byl proveden screening podle obsahu ergokristinu ve sklerociích. K dalšímu šlechtění bylo vybráno sklerocium světle hnědé barvy, které obsahovalo 1,03 % alkaloidů, ergokristinu 0,98 %. Toto sklerocium bylo převedeno do saprofytní kultury a opět podrobeno UV mutagenesi za stejných podmínek. Monokonidiové izoláty byly testovány na žitě. Ze získaných sklerocií bylo vybráno světle hnědé sklerocium s nejvyšší sumou alka-

loidů, tj. 1,3 %, které bylo převedeno do saprofytní kultury a suspenze konidií byla podrobena postupu UV mutagenese za shora uvedených podmínek. Monokonidiové izoláty byly naočkovány na žito. Získaná sklerocia byla analyzována a k dalšímu testování vybrána ta světle hnědá sklerocia, která vykazovala zvýšení obsahu ergokristinu oproti původnímu izolátu. Tato sklerocia byla převedena do saprofytní kultury, vyočkována na žito a hodnocena podle výšky obsahu ergokristinu s přihlédnutím k zastoupení doprovodných alkaloidů a podle infekceschopnosti (výše hektarových výnosů) na žitě. Takto vybraný optimální izolát byl deponován v Čs. sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 8058. Stabilita vlastností nového kmene byla potvrzena opakovanou kultivací na žitě ve 3 vegetačních obdobích na 6 lokalitách.

Použití vynálezu je dále popsáno v příkladu provedení, aniž by se tímto příkladem jakkoli omezoval způsob kultivace, použití a vlastnosti nového kmene.

Příklad provedení vynálezu

Z potřebného množství trvanlivé suché námeloviny kmene CCM 8058 vyrobené podle CS patentu 276530 se připraví vhodná suspenze konidií. Touto suspenzí konidií se pomocí očkovacího stroje naočkují klasy žita ve fázi metání tak, že se na plochu 1 ha použije $1,6 \cdot 10^{11}$ klíčených konidií. Po 35 denním růstu na žitě se provede předsběr a po dalších 20 dnech sběr narostlých sklerocií námele. Z 1 ha bylo získáno 710 kg suchých sklerocií námele obsahujících v průměru 1,26 % sumy alkaloidů, ze které bylo 82,8 % tvořeno ergokristinem, zbytek tvořil ergometrin, α -ergokryptin a klavínové alkaloidy.

Získaná droga byla vyextrahována, ergokristin vyizolován a zčásti použit pro výrobu lékových forem ergokristinu a ergotxinu, zčásti pro výrobu kyseliny lysergové a polosyntetických derivátů námelových alkaloidů. Vyextrahované doprovodné alkaloidy byly použity pro výrobu kyseliny lysergové a polosyntetických derivátů.

Průmyslová využitelnost

Vynález je využitelný ve farmaceutickém průmyslu jako kvalitativně nový zdroj námelových alkaloidů pro výrobu substancí a lékových forem ergokristinu, kyseliny lysergové a polosyntetických derivátů námelových alkaloidů, využívaných v humánní a veterinární medicíně.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., CCM 8058, který v polní kultuře na žitě vytváří sklerocia s obsahem sumy alkaloidů minimálně 0,73 % vztaženo na sušinu biomasy a s obsahem ergokristinu minimálně 80,4 % sumy alkaloidů.

Konec dokumentu
