

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

203 184 B

(21) A bejelentés száma: 2511/84
(22) A bejelentés napja: 1984.06.28.
(30) Elsőbbségi adatok:
P 33 23 411 1983.06.29. DE

(51) Int. Cl.⁵

A 01 H 1/06

(40) A közzététel napja: 1987.06.29.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1991.06.28. SZKV 91/06

(72) Feltalálók:

dr. Franz, Chlodwig, München (DE)
dr. Isaac, Otto, Hanau (DE)

(73) Szabadalmas:

Degussa Ag., Frankfurt/Main (DE)

(54) **Eljárás gyógyárú nyersanyagként használható új kamillapopuláció előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás gyógyárú nyersanyagként használható, Manzana típusú, új kamillapopuláció előállítására, amelyek 40 °C-on szárított virágai – a szárazanyagra vonatkoztatva – legalább 150 mg% kamazulént, legalább 300 mg% (-)- α -biszabololt és 50 mg%-nál kevesebb egyéb biszaboloidot tartalmaznak, és amely eljárás folyamán DEGUMILL diploid kamilla fajtát tetraploidizálunk, a kiválasztott tetraploid növényeket további szaporítási és kiválasztási lépéseknek, műveleteknek vetjük alá.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy a tetraploidizálás után

1. a tetraploid növényeket szelektáljuk, kiválasztjuk a hatóanyag-tartalom (a szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva legalább 150 mg% kamazulén, legalább 300 mg% biszabolol és 50 mg%-nál kevesebb biszaboloid), az egyidejű virágzás, az egyenletes tö-

leves elágazás, valamint a 25–35 mm közötti virágfaj nagyság szempontjából megfelelő növényeket, az így kiválasztott növényeket klónozzuk és a klónozás révén kapott növényekből vetőmagvakat nyerünk,

2. az így nyert vetőmagvakból utódokat nevelünk, majd egy 1. lépés szerinti szelektálást, kiválasztást végzünk és a kiválasztott növényekből ismét vetőmagvakat nyerünk.

3. A 2. eljárás szerinti lépéseket, illetve műveleteket 2–4-szer ismételjük,

4. a 3. lépés szerint nyert vetőmagvakból utódokat nevelünk, ezeket az 1. lépés szerint szelektáljuk, az így szelektált, kiválasztott növényeket klónozzuk, és azokból a kamillanövényekből, amelyeket így nyerünk, szaporítóanyagot és/vagy kamilla gyógyárut állítunk elő.

A leírás terjedelme: 4 oldal

HU 203184 B

A találmány tárgya eljárás gyógyáru nyersanyagként használható Manzaná típusú új kamillapopuláció előállítására, amelynek révén az eddig ismerteknél több hatóanyagot tartalmazó növény termeszthető és ebből a gyógyszerek gazdaságosabban állíthatók elő.

A valódi kamilla (*Matricaria chamomilla* L.) virágfejeit ezeknek antiflogisztikus és spazmolitikus hatása miatt széles körben alkalmazzák gyógyászati célokra. Ezek a növényi gyógyszerkincsek fontos és jelentős részét képezik. Gyógyászati szempontból különösen jelentősége van a kamazulén és az (-)- α -biszabololhatóanyagnak, ezért egy jó kamillagyógyszer ezekből a hatóanyagokból lehetőleg nagy mennyiséget tartalmaz.

A 2402802 számú német szövetségi köztársaságbeli szabadalmi leírásban és az 1035096 számú olasz szabadalmi leírásban olyan kamillafajtát ismertetnek, amelynek mind (-)- α -biszabolol, mind kamazuléntartalma nagy; e DEGUMILL elnevezésű kamillafajtának nagy (-)- α -biszabolol- és kamazuléntartalma azonban csak akkor állandó, ha megakadályozzák az olyan más kamillafajtákkal való kereszteződést, illetve idegen beporzást, amelyeknek (-)- α -biszabolol és kamazuléntartalma jelentősen kisebb. Az idegen beporzással való kereszteződés veszélye majdnem mindig fennáll, mert a hatóanyag-szegény vadkamilla gyakorlatilag mindenütt előfordul.

A találmány feladata olyan eljárás létrehozása, amelynek révén olyan kamillanövény állítható elő, amely nem hajlamos a természetben előforduló kamillapopulációkkal (vadkamillákkal) való idegen beporzódásra, amiben jelentősen nagyobb a fontos (-)- α -biszabolol- és kamazulén hatóanyag mennyisége, mint bármely ismert kamillában, például a DEGUMILL fajtában, az anyagtartalom szempontjából homogén, amelyen belül a kamazulén- és (-)- α -biszabolol-tartalom tulajdonságai állandók (azaz homozigóták), továbbá a belőle előállított gyógyszerek mind minőségi, mind mennyiségi szempontokból homogén eredményeket adnak, ezenkívül egyéb tulajdonságai is az ismert kamillák azonos tulajdonságaival legalább egyenértékűek vagy ezeknél jobbak.

A találmánnyal a kitűzött feladatot olyan eljárás létrehozásával oldjuk meg, amelynek folyamán DEGUMILL diploid kamillafajtát tetraploidizálunk, a kiválasztott tetraploid növényeket további szaporítási és kiválasztási lépéseknek, műveleteknek vetjük alá; a találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy a tetraploidizálás után

1. a tetraploid növényeket szelektáljuk, kiválasztjuk a hatóanyag-tartalom (a szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva legalább 150 mg% kamazulén, legalább 300 mg% biszabolol és 50 mg%-nál kevesebb biszaboloid), az egyidejű virágzás, az egyenletes töleveles elágazás, valamint a 25–35 mm közötti virágfejnagyság szempontjából megfelelő növényeket, az így kiválasztott növényeket klónozzuk és a klónozás révén kapott növényekből vetőmagvakat nyerünk,
2. az így nyert vetőmagvakból utódokat nevelünk, majd egy 1. lépés szerinti szelektálást, kiválasztást

végzünk és a kiválasztott növényekből ismét vetőmagvakat nyerünk,

3. a 2. szerinti lépéseket, illetve műveleteket 2–4-szer ismételjük,
4. a 3. lépés szerint nyert vetőmagvakból utódokat nevelünk, ezeket az 1. lépés szerint szelektáljuk, az így szelektált, kiválasztott növényeket klónozzuk és azokból a kamillanövényekből, amelyet így nyerünk, szaporítóanyagot és/vagy kamillagyógyárut állítunk elő. Az eljárás lefolytatásához az ismert kamillanövények közül kiinduló növényként a DEGUMILL diploid kamillafajtát használjuk, amelyeket előzőleg már valamilyen ismert módon tetraploidizáljuk.

1. lépés

A tetraploid kamillanövények közül kiválasztjuk azokat az egyedeket, amelyek

- a) gyakorlatilag egyidejűleg virágzanak,
- b) egyenletes töleveles elágazásúak és a virágok a talaj fölött keskeny, körülbelül 5 cm vastagságú rétegen belül vannak,
- c) a virágfejek nagyok, külső átmérőjük körülbelül 30 mm,
- d) legkisebb kamazuléntartalmuk 150 mg%, legkisebb biszabolol-tartalmuk 300 mg%, a biszaboloidok (főként a biszabololoxid) mennyisége pedig jóval 50 mg% alatt van. (Valamennyi érték olyan virágfejekre vonatkozik, amelyeket 40 °C-os hőmérsékleten szárítunk, és amelyek aratását, betakarítását olyan állapotban végezzük, amelyenél a virágfejek csóvirágainak körülbelül 50%-a (40–60%-a) már kivirágzott. Ezeket a növényeket klónozzuk. Ehhez a növényeket (klón anyanövényeket) először körülbelül 15 cm szárhosszúságúra visszavágjuk, 8–10 órás naphossznál és 12–14 °C hőmérsékleten újból hajtatjuk (rövid oldalhajítások). A rövid hajításokat levágjuk és egy tőzeg-homok keverék talajba tűzdeljük. A dugványok meggyökeresedése körülbelül 100% relatív légnedvesség, 15 °C levegő-hőmérséklet és 14 órás naphosszúság mellett 7–14 napig tart.

Az ismertetett szokásos klónozás (dugványos szaporítás) helyett a növény osztódásra képes szövetrészeinek in vitro szaporítása (az úgynevezett osztódószövet-szaporítás) is alkalmazható. Egy kamillatenyészet létesítéséhez a növény különböző részei alkalmasak, főként a sarjcsúcsok vagy a hónaljtrügyek.

- A növényeknek H_2O_2 -vel való leöblítése után a levél hónaljtrügyek sarjcsúcsait aszeptikus körülmények között „lamináris áramban” (nagyteljesítményű lebegőanyag szűrő turbulenciaszegény kizorító áramlással) levágjuk és olyan reagens üvegekbe rakjuk át, amelyek egy tápanyaggal, például Murashige und Skoog-féle tápanyaggal (*Physiol. Plant.* 15, 473–497, 1962) vannak megtöltve. A reagens üvegeket 12–18 órára, előnyösen 16 órára beállított naphosszúságú klímaterbe helyezük, ahol a naphosszúságot fluoreszkáló fénycsövekkel állítjuk be, és ahol a fényintenzitást 500–10 000 luxra, előnyösen 1000–3000 luxra, ahőmérsékletet pedig 15–30 °C-ra, előnyösen 22–27 °C-ra állítjuk be.

Amint a szövettényészetek jó növést mutatnak, ezeket az előzőekben említett táptalajok valamelyikére helyezzük át, amely táptalajban azonban magasabb a citokinin koncentráció (30 mg/l N⁶-izopentenil-adenin) és növesztő (0–0,3 mg/l indol-ecetsav) csak nagyon kevés van benne vagy egyáltalán nincs. Eredményként a tengelyek megnyúlnak és járulékos szervek, valamint megnőtt hónaljtrügyek képződnek. Ezek az előzőekben ismertetett módon leszedhetők és tovább nevelhetők.

A növénysszaporításhoz nagy számban létesített szövettényészeteket (például a 3. szaporítási generáció után) a levelek kialakulása és megnövése után egy olyan táptalajba helyezzük át, amelyben 10 mg/l indol-ecetsav vagy 3-indol-va-sav vagy 0,1–0,3 mg/l α -naftil-ecetsav van. Ebben a kis növények meggyökereznek és körülbelül négy hét múlva sterilizált (12 óráig 120 °C hőmérsékleten gőzölt) kerti földdel feltöltött edényekbe rakjuk át ezeket. Az edényeket a kis növényekkel együtt melegházban (az ismert dugványos szaporításnál szokásos körülmények között) tartjuk és a növényeket tovább növesztjük.

2. lépés

Az előbbieket szerint nyert növények a melegházban lévő, elszigetelt körülmények között együtt virágoznak el. A növények itt 11 cm-es edényekben állnak, amelyek kerti földdel vannak feltöltve. A környezeti hőmérséklet nappal 18–24 °C, éjjel pedig 12–14 °C, amit a téli félévben járulékos világítással (200 Watt/m²) érünk el. A vízellátás a szükség szerinti.

A szelektált egyedek összességéből 4 héten keresztül folyamatosan leszedjük azokat a virágfejeket, amelyek már elvirágoztak és közvetlenül a szétesés előtt vannak. A vetőmagvakat a learatott, leszedett virágoknak szobahőmérsékleten való utánszáritásával és a könnyű virágrészeknek kifűvésével kapjuk.

3. lépés

Az előző műveletben kapott vetőmagból szűrőpróbát, illetve mintát veszünk és ebből körülbelül 2000 utódot nevelünk ugyanolyan ökológiai feltételek mellett, mint az előző műveletnél, majd az utódokat az első műveletnél felsorolt a)–d) követelmények szerint szelektáljuk. Az így szelektált egyedekkel azután a második művelet szerint járunk el.

4. lépés

A következő művelet során az előző művelet utáni vetőmagvak egy részét összel két különböző termesztési helyen vetjük el.

Az A) termesztési hely adatai a következők: tengerszint feletti magasság 450 m, északi szélesség 48,5°, keleti hosszúság 11,5°, évi csapadékmennyiség 70 mm, mérsékelt nedves klíma, januárban –10– $\pm$ 0 °C, júliusban +10–+20 °C hőmérséklet.

A B) termesztési hely adatai a következők: tengerszint feletti magasság 200 m,

északi szélesség 42°, keleti hosszúság 1°, évi csapadékmennyiség 400 mm, mediterrán klíma, januárban $\pm$ 0– $\pm$ 10 °C, júliusban +20–+30 °C.

A magvakat mindkét termesztőhelyen szeptember végén, október elején vetjük el.

Az így kapott szántóföldi kísérleti állományt homogen növekedés, virágnagyság és aratási idő szempontjából vizsgáljuk és értékeljük, ezenkívül a virágokból vett mintákat hatóanyag-tartalom szempontjából is megvizsgáljuk. A szántóföldi állományon termelt növényekből ismét kiválasztjuk azokat az egyedeket, amelyek az első lépés, illetve művelet ismertetése során említett paramétereknek megfelelnek. Ezekből a második lépésnek, illetve műveletnek megfelelően vetőmagvakat nyerünk.

5. lépés

Ennek során a 4. lépésben kapott vetőmagvakkal a harmadik és negyedik műveletet a megadott sorrendben és módon megismételjük.

6. lépés

A hatodik művelet folyamán az ötödik lépésben nyert vetőmagvakból körülbelül 1500 egyedet termesztünk (a második műveletnél ismertetett ökológiai feltételek mellett) és ugyanolyan módon, mint az első műveletnél ismertettük, ezeket szelektáljuk. Az így szelektált növényekből kiválasztunk 34 egyedet és ezeket az első művelet szerint klónozzuk. Mindegyik klónolt növénycsoportból 10–10 növényt véletlen elosztásban 40 $\times$ 30 cm távolságban szabadföldben (a negyedik műveletnél ismertetett A) termesztőhely) elszigetelten kiiskolázunk. A talaj löszös anyag volt, pH=7,0. A kiültetést június elején, a magvak első betakarítását július közepén végezzük, ezután a növényeket visszavágjuk, újból virágoztatjuk és augusztus közepe és vége között újból magvakat takarítunk be.

A vetőmagvak betakarítását, illetve kinyerését a második művelet szerint végezzük.

A hatodik művelet után kapott vetőmaganyag az új kamillafajta szaporítóanyagát képezi. Az ebből a szaporítóanyagból termesztett növények virágai (vetés szeptemberben, októberben, betakarítás a következő év júniusának elején), amelyeket abban az időben szedünk, amikor a virágfejek csővirágai közül körülbelül 50% (40–60%) kinyílt, és amely virágokat közvetlenül a szedés után szárítószekrényben 40 °C hőmérsékleten 72 órán keresztül szárítottunk, a megszáritott virágok súlyához (száranyag-tartalom) viszonyítva például 150 mg% kamazulént, 300 mg% (-)- α -biszabololt és maximálisan 50 mg% biszaboloidot tartalmaznak.

A találmány szerinti eljárás legfontosabb előnyös tulajdonsága, hogy egyszerű műveletekkel és aránylag olcsón olyan kamillapopulációt hozunk létre, amelynek igen magas az értékes kamazulén- és (-)- α -biszabolol-tartalma, igen kevés a biszaboloid-tartalma, és ezek a tulajdonságok a növény egymás utáni éveiben

való termesztése során is változatlanok maradnak még akkor is, ha a beporzás alacsony hatóanyag-tartalmú vadkamillával történik.

SZABADALMI IGÉNYPONT

Eljárás gyógyáru nyersanyagként használható Manzana típusú, új kamillapopuláció előállítására, amelyek 40 °C-on szárított virágai – a szárazanyagra vonatkoztatva – legalább 150 mg% kamazulánt, legalább 300 mg% (-)- α -biszabololt és 50 mg%-nál kevesebb egyéb biszaboloidot tartalmaznak, és amely eljárás folyamán DEGUMILL diploid kamillafajtát tetraploidizálunk, a kiválasztott tetraploid növényeket további szaporítási és kiválasztási lépéseknek, műveleteknek vetjük alá, *azzal jellemezve*, hogy a tetraploidizálás után

1. a tetraploid növényeket szelektáljuk, kiválasztjuk a hatóanyag-tartalom (a szárazanyag-tartalomra

5 vonatkoztatva legalább 150 mg% kamazulén, legalább 300 mg% biszabolol és 50 mg%-nál kevesebb biszaboloid), az egyidejű virágzás, az egyenletes töleveles elágazás, valamint a 25–35 mm közötti virágfej nagyság szempontjából megfelelő növényeket, az így kiválasztott növényeket klónozzuk és a klónozás révén kapott növényekből vetőmagvakat nyerünk,

10 2. az így nyert vetőmagvakból utódokat nevelünk, majd egy 1. lépés szerinti szelektálást, kiválasztást végzünk és a kiválasztott növényekből ismét vetőmagvakat nyerünk,

3. a 2. szerinti lépéseket, illetve műveleteket 2–4-szer ismételjük,

15 4. a 3. lépés szerint nyert vetőmagvakból utódokat nevelünk, ezeket az 1. lépés szerint szelektáljuk, az így szelektált, kiválasztott növényeket klónozzuk és azokból a kamillanövényekből, amelyeket így nyerünk, szaporítóanyagot és/vagy kamillagyógyárut állítunk elő.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
ARCANUM Bt. – BUDAPEST