



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

196 024

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 05 10 77
(21) PV 6432 - 77

(51) Int. Cl. ³ C 12 P 1/02

(40) Zverejnené 29 06 79
(45) Vydané 01 3 82

(75)

Autor vynálezu FUSKA JÁN ing. CSc., FUSKOVÁ ALŽBĚTA ing. a ADAMKOVÁ MILKA, BRATISLAVA

(54)

Spôsob prípravy antibiotika vermicilínu s cytotoxickými účinkami na nádorové bunky

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy nového antibiotika účinného in vitro na bunky leukémie P388, L-1210 a Ehrlichovho ascitického karcinómu /EAC/, kultiváciou plesne *Penicillium vermiculatum* Dang. a izoláciou z filtrátu kultivačnej pôdy.

V rámci systematického vyhľadávania látok s potenciálnymi protinádorovými účinkami boli testované filtráty plesní izolovaných z Jáchymovských uránových baní. Aktivita filtrátov bola hodnotená k tomuto účelu vypracovanou metódou /Fuska, J. a spol., Neoplasma 18,631, 1971/, pri ktorej podľa protokolu NCI /Proposed flow of drugs through DCT screen, USA 1973/ bola ako testovací model použitá leukémia P288. Z testovaných kultúr výrazný inhibičný účinok bol zistený u filtrátu plesne *Penicillium vermiculatum* Dang., uloženej v Čs. zbierke mikroorganizmov pod číslom CCM F 276.

Vynález sa týka spôsobu prípravy nového antibiotika pomenovaného v e m i c i l l i n, ktoré je jednou z účinných zložiek filtrátu uvedeného kmeňa.

Podstata spôsobu prípravy antibiotika vermicilínu s cytotoxickými účinkami na nádorové bunky spočíva v tom, že sa *Penicillium vermiculatum* Dang. CCM F 276 kultivuje na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroj uhlíka, dusíka a minerálne soli, extrahuje z

198 024

filtrátu nafermentovanej pôdy chloroformom alebo esterami kyseliny octovej s nižšími alkoholmi, extrakt sa odparí a natibiotikum sa extrahuje do chloridu uhličitého a prečistí chromatografiou na stĺpci silikagelu. Filtrát nafermentovanej pôdy sa extrahuje chloridom uhličitým, prípadne inými chlórovanými uhľovodíkmi a po odparení do sucha sa extrahuje za zníženého tlaku petroléterom a za zníženej teploty kryštalizuje.

Vermicilín produkuje kultúra pri povrchovej i submerznej kultivácii na pôdach s obsahom uhlíka, dusíka a minerálnych solí. Po skončenej kultivácii sa izoluje z filtrátu fermentovanej pôdy pri pH 1 až 7 extrakciou vhodnými rozpúšťadlami nemiešateľnými s vodou. Zo zahustených extraktov sa získa zmes metabolitov, z ktorej sa trituráciou vhodnými rozpúšťadlami a ďalším čistením získa v kryštalickej forme ako biele až jemné nažltlé kocky. Látka silne inhibuje rast buniek leukémie P388, L-1210 a MAC, v koncentrácii 10 až 40 ug/ml. Rast *Escherichia coli* inhibuje látka v koncentrácii 100 ug/ml, nemá však v koncentrácii do 100 ug/ml inhibičný efekt na G^+ baktérie, huby a prvoky. Látka nie je totožná ani s jedným z metabolitov produkovaných roznoými kmeňmi *Penicillium vermiculatum* Dang. a to: vermiculínom /Fuska a spol. J. Antibiotics 25:208, 1972/, talaranom /Mizuno K. a spol. J. Antibiotics 27,560, 1974/ a kyselinou luteinovou /Anderson C.G., Biochem, J. 33,272, 1939/.

Vermicilin nie je podľa doteraz zistených konštánt a vlastností totožný so žiadnym z antibiotík uvádzaných v nasledujúcich monografiách: Korzybski, T. a spol. Antibiotics vol. I a II, Pergamon Press Oxford, 1967; Umezawa H. Index of antibiotics from Actinomyces, University of Tokyo Press, Tokyo 1967; Shibata S. a spol. List of fungal products, Springfield, USA, 1964; Miller, M.W. The Pfizer handbook of microbial metabolites, McGraw-Hill, New York, 1961; Turner, W.B. Fungal metabolites, Academic Press, London, 1971; Laskin, A.I. a Lechvalier, A.H. Handbook of microbiology, vol. III. C.R.A. Press, Cleveland, 1973.

Vermicilin má nasledujúce vlastnosti: bezfarebné alebo slabo nažltlé kryštály, b.t. 105 až 110°C, $[\alpha]_D^{22} - 1,0^\circ/\text{c}$ C, 5 v chloroforme/, neutrálneho charakteru obsahuje C, H, O. Je nerozpustný v benzéne, chloroforme, chloride uhličitom, n-hexane, nižších alifatických alkoholoch, petrolétere, dimetylsulfoxide, nerozpustný vo vode. UV spektrum látky vykazuje λ max. pri 218, 252, 310 nm v metanole. IČ spektrum látky má nasledujúce maxima /v/cm/: 860, 890, 905, 960, 1050, 1060, 1100, 1140, 1250, 1290, 1340, 1405, 1445, 1460, 1490, 1560, 1580, 1660, 1640, 1685, 1720, 2850, 2950, 3000. Antibiotikum dáva pozitívne reakcie s metanolicným KOH, FeCl_3 , s parami jódu a kyselinou sírovou.

Spôsoby prípravy antibiotika vermicilínu sú uvedené v nasledujúcich príkladoch.

P r í k l a d 1

Do 500 ml varnej banky sa pripraví 100 ml pôdy nasledujúceho zloženia /g/100ml/:

glukóza 9,0, kukuričný výluh /50% sušiny/ 1,0, NaNO_3 0,2, KH_2PO_4 0,1, KCL 0,05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001. Po doplnení vodovodnou vodou upraví sa pH na 6,0 až 6,7 a pôda sa sterilizuje 20 minút pri 120°C . Po ochladení sa očkuje 10 ml vegetatívneho inokula. *Penicillium vermiculatum* CCM F 276 pripraveného na pôde Czapak-Doc. Kultivuje sa na rotačnej trepačke /220 ot/min/ pri teplote 28 až 32°C po dobu 96 až 120 hodín. Po skončení fermentácie sa spojí obsah 80 baničiek a mycélium sa oddelí filtráciou. Čirý filtrát 7 500 ml /pH 3,5/ sa za neustáleho miešania extrahuje 3 500 ml chloroformu. Chloroformová fáza sa oddelí a filtráciou cez vrstvu bezvodého síranu sodného vysuší. Rozpúšťadlo sa oddestiluje za zníženého tlaku pri teplote do 40°C . Suchý odparok sa triture 3x100 ml chloridu uhličitého. Získané podiely extraktov sa spoja a za zníženého tlaku úplne odparia. Suchý zbytok 300 mg sa naniesie na kolónu naplnenú 20 g silikagélom /L/. Kolóna sa eluuje zmesou metanol:chloroform /1:1/. Frakcie obsahujúce vermicilín /kontrola na TLC/ sa spoja a zahustia na objem 5 ml a ponechajú cez noc pri teplote $+4^\circ\text{C}$. Získa sa 80 mg vermicilínu.

P r í k l a d 2

Pôda nasledujúceho zloženia g/100 ml/: glukóza 9,0, NaNO_3 0,2, KH_2PO_4 0,1, KCL 0,05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001, vodovodná voda do 100 ml, pH 6,0-6,7 sa naplní po 100 ml do 500 ml varných baniek a sterilizuje 20 minút pri teplote 120°C . Po ochladení sa naočkuje 10 ml 42 hodinového vegetatívneho inokula kmeňa *Penicillium vermiculatum* Dang. CCM F 276 a kultivuje sa trepačke po dobu 96 až 120 hodín za neustáleho miešania pri teplote 28 až 32°C . Po skončenej kultivácii sa obsah 45 baničiek spojí a filtráciou oddelí mycélium. Získa sa 3 600 ml filtrátu /pH 3,3/, ktorý sa za neustáleho miešania pri laboratórnej teplote extrahuje 1 800 ml chloridu uhličitého. Extrakt sa po oddelení od vodnej fázy vysuší filtráciou cez vrstvu bezvodého síranu sodného a za zníženého tlaku pri teplote do 40°C zbaví sa rozpúšťadla. Suchý odparok obsahujúci hlavne vermicilín sa za neustáleho miešania pri teplote laboratória extrahuje dvakrát 100 ml petroléteru /b.v. 35 až 50°C /, ktorý sa za zvýšeného tlaku pri teplote do 30°C odparí na objem 10 ml a ponechá cez noc pri $+4^\circ\text{C}$. Získa sa 32 mg vermicilínu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy antibiotika vermicilínu s cytotoxickými účinkami na nádorové bunky, vyznačujúci sa tým, že sa *Penicillium vermiculatum* Dang. CCM F 276 kultivuje na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroj uhlíka, dusíka a minerálne soli, extrahuje z filtrátu nafermentovanej pôdy chloroformom, alebo estermi kyseliny octovej s nižšími alkoholmi, extrakt sa odparí a antibiotikum sa extrahuje do chloridu uhličitého a p očistí chromatografiou na stípci silikagélu.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa filtrát nafermentovanej pôdy extrahuje chloridom uhličitým prípadne inými chlorovanými uhľovodíkmi a po odparení

198 024

do sucha sa extrahuje za zníženého tlaku petroléterom a za zníženej teploty kryštalizuje.