



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

196741

(11)

(B1)

[51] Int. Cl³
C 12 P 1/02

(22) Prihlásené 20 06 77
(21) [PV 4038—77]

(40) Zverejnené 31 07 79

(45) Vydané 10 3 83

(75)

Autor vynálezu

FUSKA JĀN ing. CSC., FUSKOVÁ ALŽBĚTA ing., BRATISLAVA
a KATZER JOZEF CSC., PRAHA

(54) Spôsob prípravy antibiotika vermistatinu s cytotoxickými účinkami na nádorové bunky

Vynález sa týka spôsobu prípravy nového antibiotika účinného in vitro na bunky leukémie P 388 a Ehrlichovho ascitového karcinómu EAC, kultiváciou plesne *Penicillium vermiculatum* Dangeard 51C1 a izoláciou látky z filtrátu po kultivácii uvedenou kultúrou.

Pre možnosť odkrývania látok s potenciálnym protinádorovým účinkom bola vypracovaná nová metóda (Fuska a spol., Neoplasma 18:631, 1971), pri ktorej sa ako hodnotiaci model použil Ehrlichov ascitový karcinóm. Neskôr bola metóda prepracovaná podľa protokolu NCI (Proposed flow of drugs through DCT screens, USA, 1973) a ako testovací model sa použila leukémia P 388, ktorá je celosvetovo pokladaná za referenčný model pre hodnotenie prírodných látok s potenciálnym pozitívnym účinkom na nádory. Vypracovanou metódou sa testovalo niekoľko sto mikrobiálnych kultúr, z nich výrazný inhibičný účinok na rast a biochemické funkcie leukémie P 388 vykazovali in vitro filtráty získané kultiváciou plesne *Penicillium vermiculatum* Dangeard 51C1. Produkčná kultúra je tiež uložená v Čsl. zbierke mikroorganizmov v Brne pod číslom CCM F 276.

Podstata predmetného vynálezu je spôsob prípravy nového antibiotika pomenovaného

vermistatin, ktoré je jednou z troch účinných zložiek filtrátu uvedeného kmeňa.

Uvedená kultúra produkuje účinný vermistatin v podmienkach povrchovej i hĺbkovej kultivácie, a to na pôdach s obsahom uhlíka, dusíka a minerálnych solí. Po skončenej kultivácii izoluje sa látka spolu s inými metabolitami extrakciou do rôznych s vodou nemiešateľných alebo obmedzene miešateľných rozpúšťadiel pri pH filtrátu 1,5—6,5. Zo zahustených extraktov získa sa zmes metabolitov, z ktorej sa ďalším čistením získa vermistatin ako slabo nažltlá alebo biela kryštalická látka vo forme ihličiek. Látka nie je účinná na gram + a gram — baktérie, huby a prvoky, má však výrazný inhibičný účinok na niektoré typy nádorových buniek, menovite na leukémiu P 388 a EAC.

Vermistatin nie je totožný s antibiotikom vermikulínom (Fuska a spol. Čsl. autorské osv. 156 641, 1974), antifungálnym antibiotikom talaronom (Mizuno a spol. J. Antibiotics 27:560, 1974) ani kyselinou luteinovou (Anderson a spol., Biochem. J., 33:272, 1939), ktoré boli izolované z rôznych kmeňov *Penicillium vermiculatum* Dangeard.

Vermistatin, ktorý tvorí bezfarebné alebo nažltlé kryštaly, má nasledujúce fyzikálno-chemické vlastnosti: b.t. 206 až 210 °C (bez

krycieho sklíčka). $[\alpha]_D^{22} - 8,5^\circ$ ($c = 0,54$ v chloroforme), molekula látky obsahuje uhlík, vodík a kyslík. Antibiotikum je rozpustné v benzéne, chloroforme, chloride uhličitom, n-hexane, n-heptane, nižších alkoholoch a ich esteroch s kyselinou octovou, dimetylsulfoxide, nerozpustné vo vode a petrolétere. V UV spektre látky v metanole pozorujú sa dva silné pásy $\lambda_{\max} = 218$ a široký pás pri 270 nm, ktorý má niekoľko výstupkov: $\lambda_{\max} = 262, 275, 283, 315$ nm. IČ spektrum látky má nasledujúce maximá (ν/cm^{-1}): 856, 868, 925, 978, 1056, 1125, 1160, 1298, 1332, 1362, 1375, 1425, 1440, 1470, 1512, 1620, 1660, 1675, 1776, 2845, 2945, 2975, 3030. Antibiotikum dáva pozitívnu reakciu s koncentrovanou kyselinou sírovou (žlté zafarbenie), pri delení má TLC v sústave chloroform:metanol (100:1) má hodnotu R_f 0,38, pri pomere rozpúšťadiel (100:10) R_f 0,699.

Na základe uvedených konštant nebola zistená totožnosť vermistatinu so žiadnym zo známych mikrobiálnych metabolitov uvedených v nasledujúcich monografiách: Korzybski T., a spol. *Antibiotics* vol. I a II, Pergamon Press, Oxford, 1967, Umezawa H., *Index of Antibiotics from Actinomycetes*, University of Tokyo Press, 1967, Shibata S., a spol., *List of Fungal Products*, Springfield USA, 1964, Miller M. W., *The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites*, Academic Press, London, 1971, Laskin A. I. a Lechevalier A. H., *Handbook of Microbiology*, vol. 3, CRC Press, Cleveland, 1973, Fuska J., a Proksa, B., *Cytotoxic and Antitumor Antibiotics Produced by Microorganismus*, *Advances in Applied Microbiology*, vol. 20, Academic Press New York-London, 1976 ani v posledných ročníkoch *Chemical abstracts*.

V nasledujúcich príkladoch sú uvedené niektoré postupy prípravy antibiotika vermistatinu.

Príklad 1

Do 500 ml varnej banky pripraví sa 10 ml pôdy nasledujúceho zloženia (g/100 ml): 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 6,0-6,6 a pôda sa sterilizuje 20 min. pri 120 °C. Po ochladení sa očkuje 10 ml vegetatívneho inokulu pripraveného kultiváciou *Penicillium vermiculatum* Dangeard na pôde Czapek-Dox. Kultivácia na rotačnej trepačke s 220

ot./min. pri teplote 28 až 32 °C trvala 96 až 120 hodín.

Po ukončenej fermentácii sa obsah baničiek spojil a mycélium sa oddelilo filtráciou cez filtračný papier. Číry filtrát (6.400 ml, pH 3,5) sa extrahoval za neustálého miešania chloroformom v pomere 1:2. Chloroformová vrstva sa oddelila a filtráciou cez vrstvu bezvodného síranu sodného vysušila. Rozpustidlo sa oddestilovalo za zníženého tlaku pri teplote 35 až 45 °C. Suchý, pevný odparok sa trituroval 3 x 100ml chloridu uhličitého a po oddelení extraktu sa ostávajúci pevný podiel znova trituroval petroléterom 4 x 50 ml, b. v. (30 až 50 °C), čím sa oddelila prevážna časť ostatných metabolitov. Suchý, pevný zvyšok obsahujúci hlavne vermistatin sa za tepla rozpustil v benzéne a ponechal cez noc pri teplote +4 °C. Získalo sa 130 mg čistého kryštalického vermistatinu.

Príklad 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 až 6,7 sa po 100 ml rozplnila do 500 ml varných baniek a po sterilizácii (20 min. pri 120 °C) a ochladení sa očkovalo 10 ml 42 hodinového vegetatívneho inokula produkčného kmeňa *Penicillium vermiculatum*. Dang. Doba kultivácie 96 až 120 hodín, na rotačnej trepačke s 220 ot./min. pri teplote 28 až 32 °C. Po ukončenej kultivácii sa získaná pôda (3.600 ml) filtráciou cez papierový filter oddelila od mycélia a extrahovala dvakrát za sebou chloridom uhličitým a potom chloroformom v pomere 1:2. Získané chloroformové extrakty obsahujúce vermistatin, sa po oddelení od vodnej fázy spojili, filtráciou cez vrstvu bezvodného síranu sodného vysušili a za zníženého tlaku oddestilovali do sucha, pri teplote 35 až 40 °C. Suchý odparok sa trikrát po sebe trituroval 100 ml petroléteru, čím sa oddelila prevážna časť ostatných sprievodných metabolitov. Vermistatin prítomný v pevnom zvyšku po triturácii sa rozpustil v benzéne (5 ml) a po oddelení nerozpustného podielu sa ponechal roztok 16 hodín pri teplote +4 °C. Vermistatin, ktorý kryštalizoval vo forme bielych ihličiek sa zachytil no filtra a rovnakým spôsobom ešte dvakrát rekryštalizoval z benzénu. Získaný produkt (120 mg) mal b. t. 206 až 210 °C. Na rekryštalizáciu látky možno za rovnakých podmienok použiť tiež éster kyseliny octovej s nižšími alkoholmi, napr. octanu etylatého.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob prípravy antibiotika vermistatinu s cytotoxickými účinkami na nádorové bunky, vyznačujúci sa tým, že sa *Penicillium vermiculatum* Dangeard CCM F 276 kultivuje na tekutej živnej pôde obsahujúcej zdroj uhlíka, dusíka a minerálne soli a po oddelení mycélia sa z filtrátu extrahuje látka chloroformom alebo éstermi kyseliny octovej s nižšími alkoholmi, ktoré sa za zníženého tlaku oddestilujú a pevný zbytok po triturácii chloridom uhličitým, obsahujúci vermistatin sa niekoľkokrát rekryštalizuje z benzénu alebo octanu etylnatého.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa filtrát po oddelení mycélia extrahuje postupne nižšími chlorovanými uhľovodíkami s výhodou chloridom uhličitým a potom chloroformom, rozpúšťadlo-chloroform, ktoré obsahuje hlavne vermistatin, sa za zníženého tlaku oddestiluje a pevný zbytok sa tritureuje niekoľkokrát petroléterom, z ostávajúceho nerozpoštného zbytku, obsahujúceho prevažne vermistatin sa dvoj-trojnásobnou rekryštalizáciou z benzénu, po odfarbení aktívnym uhlím a ochladením získa kryštalický vermistatin.