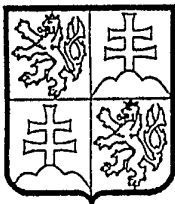


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 627

(21) Číslo přihlášky : 1802-89.M

(22) Přihlášeno : 23 03 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :
C 12.N 1/20

(40) Zveřejněno : 18 03 92

(47) Uděleno : 20 05 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 15 07 92

(73) Majitel patentu : GALENA s.p., OPAVA-KOMÁROV

(72) Původce vynálezu : POVAŽSKÁ HANA Pharm.Dr.,
VALÍK JOSEF RNDr.,
MALINKA ZDENĚK RNDr.,
SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA

(54) Název vynálezu : Nový průmyslový kmen mikroorganismu druhu
Claviceps purpurea (Fr.) TUL. CCM 8059

(57) Anotace :

Vynález se týká oborů mikrobiologie, mykologie, biotechnologie a farmaceutického průmyslu.
Účelem vynálezu je optimalizace surovinové základny pro výrobu alfa-ergokryptinu a jeho polosyntetických derivátů. Jako surovinová základna slouží sklerocia námele, obsahující námelové alkaloidy. Uvedeného účelu se dosáhne vypěstováním a použitím sklerocií nového průmyslového kmene mikroorganismu Claviceps purpurea (Fr.) Tul. CCM 8059. Sklerocia jsou získávána v množství průměrně 665 kg/ha a obsahují námelové alkaloidy v množství 0,45 až 0,82 % sušiny. Ve sklerociích je minimálně 95,6 % sumy alkaloidů tvořeno alfa-ergokryptinem.

Vynález se týká nového průmyslového kmene mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., vyznačujícího se při polní kultivaci na žitě vysokým obsahem alfa-ergokryptinu, minimálním zastoupením nežádoucích doprovodných alkaloidů a velmi vysokými hektarovými výnosy námelové drogy.

Alfa-ergokryptin je námelový alkaloid s významnými léčivými účinky. V terapeutické praxi je používán většinou v determinované směsi s jinými námelovými alkaloidy, případně samostatně. Alfa-ergokryptin je dále základní substancí pro výrobu polosyntetických derivátů, vyznačujících se rozšířenými a novými fyziologickými účinky.

Alfa-ergokryptin může být získáván ze sklerocií houby kultivované paraziticky v polní kultuře na žitě či jiných obilovinách nebo fermentačními postupy. Pomocí těchto postupů, popsaných v odborné a patentové literatuře, je dosud získávána směs alkaloidů, ve které je alfa-ergokryptin více či méně zastoupen. Pro přípravu léčebných substancí o přesně definovaném složení a pro výrobu polosyntetických derivátů je nezbytné mít k dispozici vysoce čistý alfa-ergokryptin. Hlavním nedostatkem popsaných způsobů výroby alfa-ergokryptinu jsou nezbytné složité izolační operace, při nichž odpadají i dále neupotřebitelné toxické minoritní námelové alkaloidy.

Tyto nedostatky do určité míry odstranil vynález (čs. autorské osvědčení č. 222150), kterým je nový průmyslový kmen CCM F-672, produkující námelovou drogu s velmi čistým alfa-ergokryptinem. Jeho nedostatkem je však ve srovnání s některými jinými vyšlechtěnými kmeny relativně průměrný obsah námelových alkaloidů a zejména nízký hektarový výnos, způsobující vyšší náklady na získání drogy polní kultivací.

Uvedené nedostatky kmenů námele pro polní a fermentační produkci alfa-ergokryptinu odstraňuje (do značné míry) vynález, jímž je nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., uložený v Čs. sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod označením CCM 8059.

Hlavní výhodou nového kmene je při kultivaci na žitě velmi vysoký hektarový výnos sklerocií, který při recentně užívané agrotechnice pěstování dosahuje minimálně 572 kg/ha a průměrně 665 kg/ha a vysoká produkce sumy alkaloidů ve sklerociích, která dosahuje průměru 0,52 % (minimum 0,45 %) sušiny biomasy. Další výhodou nového kmene je velmi nízká tvorba doprovodných alkaloidů, které tvoří nejvýše 4,4 % sumy alkaloidů a vysoké zastoupení alfa-ergokryptinu, který tvoří minimálně 95,6 % sumy alkaloidů. Vlastnosti nového kmene umožňují získat při polním pěstování drogu (sklerocia) s nižšími náklady, než při pěstování dosud užívaného kmene CCM F-672, při současné úspoře orné půdy, potřebné k produkci stejného množství drogy. Při využití této drogy k výrobě produktů na bázi alfa-ergokryptinu dojde k zefektivnění postupů extrakce a izolace zejména snížením spotřeby materiálu, energie a pracnosti.

Popis vlastností nového kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. CCM 8059:

Při saprofytní kultivaci na sladidlovém agarem ztuženém médiu tvoří houba kolonie z typického sfaceliového vzdušného mycelia. Mycelium je poměrně bohatě větvené, bílé, s postranními hyfami ukončenými konidiogenními buňkami. Konidie mají průměrné rozměry 7,8 x 6 mikrometrů. Starší kultury od 10. až 14. dne kultivace jsou velmi slabě béžovo-fialově pigmentované.

Při parazitní kultivaci na žitě tvoří houba zpočátku světle béžová, později tmavá, černofialově pigmentovaná sklerocia o váze v rozmezí 0,018 až 0,110 g (průměr 0,069 g). Sklerocia obsahují námelové alkaloidy v množství od 0,45 % do 0,82 % sušiny biomasy při průměru 0,52 %. Minimálně 95,6 % sumy alkaloidů je tvořeno alfa-ergokryptinem (průměrně tvoří 97,1 % sumy). Zbytek, nejvýše 4,4 % sumy, je tvořen doprovodnými alkaloidy ergometrinem, stopami kyseliny lysergové a ergokorninem.

Nový produkční kmen byl vyšlechtěn z původního produkčního kmene CCM F-672. Sklerocium tohoto kmene, obsahující 0,50 % sumy alkaloidů, bylo převedeno do saprofytní kultu-

ry a vytvořené konidie byly ozařovány UV zářením o výkonu $15 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ po dobu 220 sekund, kdy přežívalo 0,76 % konidií. Po ozařování byla suspenze konidií monosporicky rozizolována. Postup UV-mutagenese a monokonidiové izolace byl za stejných podmínek opakován pětkrát. Potom byly kultury z jednotlivých monokonidiových izolátů naočkovány na žito. Byl proveden screening podle intenzity infekce a obsahu alkaloidů v průměrném vzorku. U kultur, vykazujících oproti mateřskému kmeni zvýšení vypočtených hektarových výnosů a zvýšení obsahu alkaloidů, byla analyzována jednotlivá sklerocia. Z analyzovaných sklerocií bylo pro další šlechtění vybráno sklerocium obsahující 0,56 % sumy alkaloidů. Sklerocium bylo převedeno do saprofytní kultury a připravená suspenze konidií byla podrobena postupu UV-mutagenese a monokonidiové izolace popsané výše opakovaně třikrát. Takto získané kultury monokonidiových izolátů byly naočkovány na žito. Na základě hodnocení infekceschopnosti kultur a analytického stanovení alkaloidů ve sklerociích byl vybrán kmen označený CCM 8059, který je předmětem vynálezu a vyznačuje se výše uvedenými vlastnostmi. Stabilita vlastností byla potvrzena opakovanou kultivací na žitě ve dvou vegetačních obdobích celkem na 6 rozdílných lokalitách.

Způsob kultivace nového kmene pro získání výchozí suroviny k izolaci alfa-ergokryptinu je doložen v příkladě použití, aniž by se tímto příkladem jakkoli omezovaly vlastnosti nového kmene, způsob jeho kultivace a použití ve výrobě.

Příklad použití:

Z potřebného objemu saprofytní kultury kmene CCM 8059 se připraví vodná suspenze konidií. Suspenzi konidií se pomocí očkovacího stroje naočkují klasy žita ve fázi metání tak, že na plochu 1 ha se použije $5 \cdot 10^{11}$ živých konidií. Po 38 denním růstu se provede předsběr a po dalším 17 denním růstu konečný sběr narostlých sklerocií námele. Z jednoho hektaru žita bylo získáno 665 kg suchých sklerocií námele, obsahujících 0,56 % sumy alkaloidů, ze které bylo 96,9 % tvořeno alfa-ergokryptinem, 3,1 % bylo tvořeno ergometrinem, ergokorninem a kyselinou lysergovou. Získaná droga byla vyextrahována, extrakty byly zčásti použity pro výrobu čistého alfa-ergokryptinu do finálních lékových forem, zčásti pro polosyntetickou výrobu 2-brom-alfa-ergokryptinu.

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

Nový průmyslový kmen mikroorganismu *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. CCM 8059 produkující alfa-ergokryptin.