



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 613

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 13 06 79
(21) PV 4080-79

(51) Int. Cl.³ C 07 D 519/02

(40) Zveřejněno 30 04 80

(45) Vydáno 01 06 83

(75)
Autor vynálezu

KYBAL JAN RNDr. CSc., PRAHA
MALINKA ZDENĚK RNDr., TŘEBÍČ
HARAZIM PAVEL ing., KOEŘICE

STUHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ
SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA
SVOBODA EDUARD ing., PRAHA

(54) Způsob fermentační přípravy námelových alkaloidů s řízeným poměrem ergokorninu, α -ergokryptinu a β -ergokryptinu

1

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy námelových alkaloidů s řízeným poměrem ergokorninu, α -ergokryptinu a β -ergokryptinu stacionární kultivací produkčního kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul na živném médiu, obsahujícím zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, stopové prvky a/nebo růstové látky, při teplotě 18 až 30 °C a hodnotě pH živného média 3,8 až 7,0. Ovlivnění poměru mezi množstvím produkovaného ergokorninu a ergokryptinu a mezi množstvím produkovaného α - a β -ergokryptinu se dosahuje přidávkou malého množství různých aminokyselin do živného média.

Ergokryptin je významnou účinnou substancí a výchozí látkou pro přípravu derivátů a z nich připravovaných lékových forem. Nověji se do terapie prosazují lékové formy s přesně definovaným poměrem α - a β -ergokryptinu 1,5 : 1 až 2,5 : 1 a polosyntetické preparáty na bázi čistého -ergokryptinu. Tím se dosáhne žádaného definovaného složení a standardních terapeutických účinků.

Strukturu ergokryptinu, který obsahuje v peptidové části molekuly L-leucin, popsali poprvé Stoll a Hofmann (Helv. Chim. Acta 26, 1570, 1943). Po objevení β -ergokryptinu byl označen jako α -ergokryptin. Beran a Semonský (Čs. farmacie 1962) popsali pod označením EK 115 odlišnou látku podobných vlastností. Strukturu této látky popsal poprvé Schlientz se sp. (Experientia 23, 991, 1967) a označili ji β -ergokryptin. Na rozdíl od α -ergokryp-

202 613

tinu obsahuje β -ergokryptin v peptidové části molekuly L-isoleucin. Izolaci, fyzikální, chemické a farmakologické vlastnosti β -ergokryptinu popsali Schlientz se sp. (Pharm. Acta Helv. 43, 493, 1968). Kmen *Claviceps purpurea*, který má schopnost produkovat β -ergokryptin na běžných půdách při submerzní kultivaci, popsal Bianchi se sp. (Experientia 32, 2, 1976).

Průmyslově využívaný ergokornin-ergokryptinový produkční kmen *Claviceps purpurea*, pěstovaný v polní kultuře na žitě, vykazuje poměr α - : β -ergokryptinu 4 : 1 až 6 : 1. Poměr ergokorninu k ergokryptinu je 3 : 2. V myceliu produkčního kmene *Claviceps purpurea*, který má schopnost vytvářet ergokornin a ergokryptin fermentačně, je poměr těchto alkaloidů 1 : 1 až 1,2 a poměr obou ergokryptinových alkaloidů 10 až 15 : 1 ve prospěch α -ergokryptinu. Vzhledem k požadovanému poměru α - a β -ergokryptinu v konečné léčivé formě 1,5 až 2,5 : 1 a rovněž vzhledem k potřebě čistého α -ergokryptinu je příprava takových preparátů z výchozího materiálu uvedeného složení značně náročná a ztrátová. Rovněž šlechtění nového produkčního kmene pro fermentační nebo polní přípravu námelové drogy s požadovaným zastoupením složek je materiálově i časově velmi náročné.

Autoři vynálezu zjistili, že obohacením živného média při stacionární kultivaci isoleucinem nebo threoninem, popřípadě kombinací těchto aminokyselin a rovněž leucinem, má vliv na vzájemný poměr biosyntetizovaného ergokorninu k ergokryptinu a na poměr α - a β -ergokryptinu ve fermentačně připravovaném myceliu produkčního kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Isoleucin tvoří součást molekuly β -ergokryptinu, threonin je u mikroorganismů jednou z výchozích substancí v biosyntéze isoleucinu a leucin tvoří součást molekuly α -ergokryptinu. Poměr mezi množstvím biosyntetizovaného α - a β -ergokryptinu je zřejmě určen aktuální koncentrací disponibilního leucinu a isoleucinu, resp. vzájemným poměrem obou těchto aminokyselin v buněčném poolu produkujícího mycelia. Přídavkem isoleucinu, popřípadě threoninu, lze měnit tento poměr ve prospěch β -ergokryptinu a naopak přídavkem leucinu ve prospěch α -ergokryptinu. Přídavek kterékoli z uvedených aminokyselin nebo jejich směsí mění poměr mezi množstvím biosyntetizovaného ergokorninu a ergokryptinu ve prospěch ergokryptinu.

Na základě uvedených poznatků byl vypracován způsob fermentační přípravy námelových alkaloidů s řízeným poměrem ergokorninu, α -ergokryptinu a β -ergokryptinu stacionární kultivací produkčního kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul na živném médiu, obsahujícím zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, stopové prvky a/nebo růstové látky, při teplotě 18 až 30 °C a hodnotě pH živného média 3,8 až 7,0, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se kultivace provádí na živném médiu, obsahujícím 0,01 až 0,4 % hmot. L-leucinu a/nebo DL-leucinu nebo stejné množství L-isoleucinu a/nebo DL-isoleucinu a/nebo L-threoninu a/nebo DL-threoninu.

Účinek dosahovaný způsobem podle vynálezu dokládá skutečnost, že v příkladech provedení použitý produkční kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul je mutantou, která produkuje ergokornin a ergokryptin v buňkách mycelia při povrchovém růstu na umělém živném médiu.

Při růstu na původní standardní půdě bez přidavku aminokyselin obsahuje mycelium ergokryptin a ergokornin v poměru 1 až 1,2 : 1 a - a -ergokryptin v poměru 10 až 15 : 1.

Vynález řeší ekonomicky výhodnou fermentační přípravu námellového mycelia s možností řízeného ovlivňování produkce α - a β -ergokryptinu ve prospěch buď α -ergokryptinu, nebo β -ergokryptinu, a řízeného ovlivňování poměru ergokryptin : ergokornin ve prospěch ergokryptinu. Proti obvyklému postupu fermentační přípravy námellového mycelia je tím umožněna příprava výchozí suroviny pro izolaci čistých alkaloidů s žádaným poměrem α - a β -ergokryptinu, popřípadě s čistým α -ergokryptinem, při respektování žádaného složení lékových forem a za použití jednoduchých izolačních postupů. Vynález umožňuje rovněž proti požadovanému poměru α - : β -ergokryptinu získat β -ergokryptin ve velkém nadbytku. Tento nadbytečný β -ergokryptin potom může být použit k obohacení lékových forem námellových alkaloidů, připravených z námellové drogy z polní produkce, na žádaný poměr.

Způsob fermentační přípravy námellových alkaloidů s řízeným poměrem ergokorninu a ergokryptinu a s řízeným poměrem α -ergokryptinu a β -ergokryptinu je v následujících příkladech blíže popsán, aniž by byl jimi jakkoliv omezen.

Příklady provedení

Příklad 1

Příprava inokula

Malý kousek suchého sklerociového mycelia, sloužícího jako konzerva produkčních kmenů, se přenesse na povrch agarem ztužené sporulační půdy, umístěné ve zkumavce, která má toto složení (v % hmot.):

kyselý hydrolyzátní kaseinu	1
sladina pivovarská	5 °Bé
agar	2
pH bez úpravy	
sterilizace 20 minut při 121 °C.	

Po 21 denní inkubaci při 24 °C se vatovým tamponem setřou z povrchu narostlé kultury konidie a naočkují na sporulační půdu výše uvedeného složení ve zkumavkách. Po opětovné 21 denní kultivaci při 24 °C se získá potřebné množství konidií. Konidie se suspendují v množství 1 až 4 . 10⁸ vatovým tamponem do 80 ml inokulační půdy, umístěné v 300 ml Erlenmayerově baňce, která má toto složení (v % hmot.):

sacharóza	5
kukuřičný extrakt	2
fosforečnan draselný prim.	0,1
destilovaná voda do	100,00

202 813

pH (amoniak)

6,2

sterilizace 20 minut při 118 °C.

Naočkované buňky se inkubují 48 hodin při 24 °C na rotačním třepacím stroji.

Takto připravené inkulum se používá pro naočkování produkční půdy, umožňující produkci námelových alkaloidů.

Produkční stupeň

Produkční půda, která má toto složení (v % hmot.):

sacharóza	30
kukuřičný extrakt	0,4
terc. citronan amonný	1,0
síran hořečnatý kryst.	0,1
dušičnan vápenatý kryst.	0,144
fosforečnan draselný prim.	0,04
destilovaná voda do	100,00
sterilizace 20 minut při 118 °C,	

obohacená 0,1 % hmot. L-isoleucinu, se naplní po 40 ml do 200 ml Blackeových baněk a naočkuje se 0,5 % obj. připraveného inokula a baňky se kultivují 21 dní při 24 °C.

Narostlé mycelium se promyje a usuší. Pomocí modifikované Rumpelovy analytické metody (Pharmazie 10, 204, 1955) se stanoví sumární obsah alkaloidů v myceliu; chromatografií na tenké vrstvě, popřípadě vysokotlakou kapalinovou chromatografií se stanoví složení alkaloidního spektra. V případě obohacení standardní produkční živné půdy 0,1 % hmot. L-isoleucinu byla suma alkaloidů 0,51 % hmot. v sušině mycelia, poměr ergokryptinu k ergokorninu byl 3 : 1, poměr α - k β -ergokryptinu byl 1 : 5.

Příklad 2

Inokulum se připraví stejně jako v příkladu 1. V produkčním stupni se použije standardní produkční půdy, obohacené 0,02 % hmot. L-isoleucinu. Další postup kultivace a zpracování je stejný jako v příkladu 1. Suma alkaloidů byla 0,86 % hmot., poměr ergokryptin : ergokornin byl 2 : 1, poměr α - : β -ergokryptinu byl 1 : 1.

Příklad 3

Inokulum se připraví stejně jako v příkladu 1. V produkčním stupni se použije standardní produkční půdy, obohacené 0,01 % hmot. L-isoleucinu. Další postup a zpracování je stejný jako v příkladu 1. Suma alkaloidů byla 0,85 % hmot., poměr ergokryptin : ergokornin byl 1,5 : 1, poměr α - : β -ergokryptin byl 2 : 1.

Příklad 4

Inokulum se připraví stejně jako v příkladu 1. V produkčním stupni se použije standardní produkční půdy, obohacené 0,1 % hmot. D,L-threoinu. Byla nalezena suma alkaloidů 0,61 % hmot., poměr ergokryptin : ergokornin 1,5 : 1, poměr α - : β -ergokryptin byl 2,4 : 1.

Příklad 5

Inokulum se připraví stejně jako v příkladu 1. V produkčním stupni se použije standardní produkční půdy, obohacené 0,1 % hmot. L-leucinu. Suma alkaloidů byla 0,66 % hmot., poměr ergokryptin : ergokornin byl 3 : 1, α - : β -ergokryptin byl 100 : 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob fermentační přípravy námelových alkaloidů s řízeným poměrem ergokorninu, α -ergokryptinu a β -ergokryptinu stacionární kultivací produkčního kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul na živném médiu, obsahujícím zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, stopové prvky a/nebo růstové látky, při teplotě 18 až 30 °C a hodnotě pH živného média 3,8 až 7,0, vyznačující se tím, že se kultivace provádí na živném médiu, obsahujícím 0,01 až 0,4 % hmot. L-leucinu a/nebo DL-leucinu nebo stejné množství L-iso-leucinu a/nebo DL-iso-leucinu a/nebo L-threoninu a/nebo DL-threoninu.