(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

ROMÂNIA

(11) **RO 128512 A2**

(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01);
C12N 1/38 (2006.01);
C12N 15/00 (2006.01)

(12) # CERERE DE BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01301**

(22) Data de depozit: **05.12.2011**

(41) Data publicării cererii:
28.06.2013 BOPI nr. **6/2013**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE IAŞI, FILIALĂ A INCDSB BUCUREŞTI**, *STR. LASCĂR CATARGI NR. 47, IAŞI, IS, RO*

(72) Inventatori:
• **ROŞU CRĂIŢA MARIA**, *STR. PĂCURARI NR. 18, BL. 3, SC. D, ET. 1, AP. 4, IAŞI, IS, RO;*
• **ROTINBERG PINCU**, *STR. ION CREANGĂ NR. 73, BL. J 3, SC. B, AP. 9, IAŞI, IS, RO;*
• **OLTEANU ZENOVIA**, *SPLAI BAHLUI NR.29, BL. 5, ET.3, AP.14, IAŞI, IS, RO;*
• **SURDU ŞTEFANIA**, *STR. DECEBAL NR. 25, BL. Z11, SC. B, ET. 3, AP. 12, IAŞI, IS, RO;*
• **TRUTA ELENA**, *STR. ARCU NR. 27, BL. L19, AP. 19, IAŞI, IS, RO;*
• **MIHAI COSMIN TEODOR**, *STR. PĂCURARI NR. 128, BL. 586, SC. A, ET. II, AP. 8, IAŞI, IS, RO;*
• **HRITCU LUMINIŢA**, *STR. CODRESCU NR. 7C, BL. B3, SC. B, ET. 4, AP. 10, IAŞI, IS, RO;*
• **GHERGHEL DANIELA**, *BD. SOCOLA NR. 22, BL. T1, AP. 29, IAŞI, IS, RO;*
• **HĂNCIANU MONICA**, *STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 16D, IAŞI, IS, RO;*
• **MIRON ANCA**, *ALEEA DOMENII NR. 23, IAŞI, IS, RO;*
• **APROTOSOAIE ANA CLARA**, *ŞOS. NAŢIONALĂ NR. 76, BL. C4, SC. A, ET. 3, AP. 3, IAŞI, IS, RO;*
• **CIOANCA OANA**, *STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 6, IAŞI, IS, RO*

(54) # PREPARAT DE TIP CLAVINIC CU ACŢIUNE ANTITUMORALĂ, DE UZ VETERINAR ŞI PROCEDEU DE OBŢINERE

(57) **Rezumat:**

Prezenta invenţie se referă la un preparat de tip clavinic cu acţiune antitumorală, de uz veterinar, şi la un procedeu pentru obţinerea acestuia. Conform invenţiei, produsul constă dintr-o fracţiune alcaloid clavinică, extrasă din *Claviceps purpurea*, dizolvată în DMSO la o concentraţie de 250 mg/ml. Procedeul de obţinere a preparatului constă în obţinerea unui extract activ din miceliu liofilizat al tulpinii de *Claviceps purpurea*, cultivată submers, într-un mediu de fermentaţie slab aerat, conţinând în principal zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu şi extract de drojdii, după care miceliul este extras cu apă, extractul obţinut este extras cu hexan, pentru delipidare, şi extractul micelian rămas se alcalinizează la *p*H = 9, cu hidroxid de amoniu, şi alcaloizii bază liberă se extrag cu cloroform, extractele în cloroform se concentrează la sec, rezultând un reziduu uscat gălbui, cu aspect onctuos şi miros înţepător, care se dizolvă în DMSO şi se păstrează la 4...5°C, în flacoane de culoare închisă.

Revendicări: 5
Figuri: 6

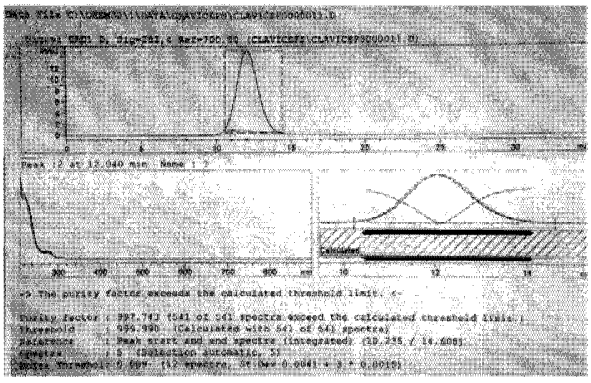

Fig. 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecţia conferită potrivit dispoziţiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepţia cazurilor în care cererea de brevet de invenţie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecţiei conferite de cererea de brevet de invenţie este determinată de revendicările conţinute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).

RO 128512 A2

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Cerere de brevet de invenţie
Nr. a 2011 01301
Data depozit 05 -12- 2011

Preparat de tip clavinic cu acţiune antitumorală, de uz veterinar şi procedeu de obţinere

Invenţia se referă la un produs medicamentos de uz veterinar, cu acţiune antitumorală, a extractului fungal de tip clavinic (agroclavina) şi procedeul de obţinere, prin cultivarea submersă a tulpinii de *Claviceps purpurea*.

Sunt cunoscute speciile genului *Claviceps spp.* (Fr.) Tul. (*Hypocreaceae*) ce produc diferite tipuri de alcaloizi ergotici (in principal de tip ergolinic), care au un spectru larg de activitati biologice. Agroclavina, alcaloid de tip clavinic (derivati ai dimetilergolinelor), este unul dintre produşi, cu proprietăţi agoniste D_1-dopaminei şi α_1-adrenoceptorilor (BERDE, 1984, cf. STAREC et al., 2001), de intensificare a activitatii celulelor NK (natural killer) şi producţiei de IL-2 (interleukină) şi γ-interferon până la concentraţii de 10^{-7} – 10^{-8}M (FISEROVA et al., 1997, Starek et al., 2001) si cu efect vasoconstrictor (Eich et. Al, 1984).

Agroclavina, festuclavina si unii dintre derivatii lor sintetici sunt evidenţiaţi doar experimental cu efecte antineoplazice, nefiind cunoscute până în prezent produse farmaceutice. De asemenea, activitatea antineoplazică a agroclavinei este comparabilă cu cea a citostaticelor utilizate în clinici, de tipul bleomicinei, adriamicinei si daunomicinei (EICH et al., 1986; KREN et al., 1997). Clavinele active cauzeaza „creştere neechilibrată", o proprietate pe care o împart cu alţi agenţi citostatici care acţionează selectiv, prin inhibarea sintezei ADN-ului, deci a unei interferenţe cu starea de organizare a reticulumului nuclear (Eich et al., 1986).

Mecanismul de actiune este considerat ca unul fundamental nou pentru compusii ergolinici, fapt important pentru crearea de noi medicamente.

Dezavantajele produselor de sinteză sau semisinteză, constau în asigurarea doar a unei remisiuni temporare a tumorilor şi au grade diferite de

toxicitate pentru organism, cu efecte secundare la nivelul sistemului hemato – poietic si aparatului digestiv, de tipul: leucopenie, trombocitopenie, creşterea semnificativă a enzimelor hepatice, hipo – gammaglobulinermia (Methotrexat), supresia maduvei osoase (Chlorambucil), neutropenie (Cyclophosphamid), scadere a numarului de leucocite sau de plachete (Vincristin), trombocitopenie, anemie, cu reducerea clearance-ului creatininei; hipomagnezinemie, hipocalcemie, hipopotasemie; cresterea tranzitorie a transaminazelor serice (Cisplatin), la care se adaugă numeroase reacţii adverse.

Pentru producerea la scara industriala a compusilor clavinici de interes farmaceutic si medical, se utilizeaza in special tulpini de *Claviceps fusiformis*, *Claviceps paspali* si *Claviceps purpurea*.

Sunt cunoscute (Z. Rehacek, 1978) procedee de cultivare industriala a unor tulpini mutante de *Claviceps purpurea* CP 7/5 CCM F-630 (brevet CS 204301), CP7/63 CCM F-631 (brevet CS 204302) si CP7/274 CCM F-632 (brevet 204303) producatoare de agroclavina si elimoclavina (predominant). Trin M (brevet US4618581/1986) stabileste conditiile de cultivare submersa a tulpinii de *Claviceps fusiformis* nr. 00211. pentru obtinerea elimoclavinei, utilizata in tratamentul bolii Parkinson si ca inhibitor a secretiei de prolactina (B. Berde si O. Schild: Ergot alkaloids and related compounds; Handb. Exp. Pharm., 49, Springer Verlag, Berlin, 1978).

Aceste brevete au in comun doar biosinteza alcaloizilor clavinici de catre specii ale genului *Claviceps* spp., printr-un proces de fermentatie, in conditii aerobe, pH =5,5 si temperatura de 24^0 C, sursele nutritive si precursorii variind in functie de alcaloidul urmarit, nefiind insa orientate catre prin obtinerea unui produs agroclavinic de uz farmaceutic.

Procesul de extractie, la nivel industrial, a alcaloizilor ergotici, din cultura fungica, presupune protocoale de lucru care au in comun utilizarea acelorasi grupe de solventi, cum ar fi: dietil –eter (CS 264 880, CS 264 881), cloroform – alcool isopropilic (US4618581, US 388 4762), etanol sau metanol (DP 47 315, DP 697 760). etc. Dezavantajul utilizarii unora dintre ei consta fie in toxicitatea (dietil-eter) fie in lipsa de selectivitate in extractia aclaloizilor clavinici.

Problema pe care o rezolvă invenţia este crearea unui biopreparat de natura clavinica, cu origine in tulpina de *Claviceps purpurea*, ca produs natural, cu efect antitumoral si de uz veterinar, constituit din agroclavina (substanta activa), a cărui acţiune este verificată prin experimente *in vitro* (pe celule tumorale HeLa) si *in vivo* (pe animale cu tumori induse sau in diferite faze de evoluţie), cu eficienta in doze mici (50µg/kg corp) şi cu toxicitate redusa, şi a procedeului de obţinere a produsului cu o compoziţie reproductibilă cantitativ şi calitativ, în ceea ce priveşte compoziţia mediului de cultura utilizat si timpului de fermentatie, cat si metodei de extractie si purificare, cu hexan si cloroform, produsul obtinut (extract clavinic – agroclavina) putând fi utilizat in stare solvita şi diluat in momentul utilizării până la doza terapeutică, în cazul injectării intratumorale sau intravenoase.

Preparat cu acţiune antitumorală, de uz veterinar şi procedeul de obţinere **conform inventiei inlatura dezavantajele soluţiilor cunoscute prin aceea ca** este constituit ca produs, pornindu-se de la o tulpina de *Claviceps purpurea*, crescută pe mediu solid T2, la 28°C, timp de 21 de zile, cultivata în flacoane

Erlenmeyer de 500 ml, cu 100 ml mediu SC100 pentru obtinerea inoculului in doua faze (2+4 zile), la 24°C si 200 rot/min pe agitator rotativ, inoculul obtinut fiind transferat in 7 l mediu de fermentație, intr-un bioreactor in procent de 1% biomasa umeda/l mediu de fermentatie CS2 (in 3 variante adaptate dupa Pazoutova, 1981), parametri de proces fiind setați la 200 rot/min, 24°C, aerare de 1 si 0,5 vvm (volum aer/volum mediu/min) si presiune a O_2 variabila, biomasa rezultata dupa 7 zile de fermentatie fiind recoltata, filtrata, spalata cu apa distilata si liofilizata, productia maxima fiind de 35 g miceliu liofilizat/l cultura, continut alcaloidic total de 96,14 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv de 3,17mg mg/100 ml lichid de cultura

Produsul clavinic (concentratie maxima de 4.1530 mg agroclavina/ 100 mg fractiune extractiva) este obtinut prin extractia apoasa a miceliului liofilizat in raport de 1:10, extractul apos fiind ulterior supus delipidarii cu hexan, faza hexanică îndepărtată, iar extractul micelian delipidat este alcalinizat la pH=9,0 cu hidroxid de amoniu 25%, extras ulterior de 3 ori succesiv cu cloroform, faza organica separată, concentrată la sec sub presiune redusă, la 35°C, iar produsul final este obtinut prin resolvirea fractiei uscate in DMSO, concentratia ajustata la 250 µg/ml, si pastrat la intuneric si temperatura de 4 – 8°C.

Se dau in continuare 3 exemple de obținere a produsului în 3 variante de mediu de cultură diferite, caracterizate prin figurile 1 - 6 şi tabelele 1 – 5, reprezentând

Figura 1. Cromatograma HPLC a amestecului de substanțe etalon
Figura 2. Spectrele de absorbție ale substantelor etalon în domeniul 200 – 400 nm (**A** – acidul ergocorninei ; **B** – agroclavina ; **C** – ergocriptina; **D** – ergocristina)
Figura 3. Formula de calcul pentru cuantificarea componentului din proba
Figura 4. Puritatea peak-ului corespunzator probei F1(raportul spectral detaliat: semnalul inregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.098 – stanga jos; puritatea si simetria peak-ului – dreapta jos)
Figura 5. Puritatea peak-ului corespunzator probei F2 (raportul spectral detaliat: semnalul inregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.098 – stanga jos; puritatea si simetria peak-ului – dreapta jos)
Figura 6. Puritatea peak-ului corespunzator probei F3 (raportul spectral detaliat: semnalul inregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.019 – stanga jos; puritatea si simetria peak-ului – dreapta jos)

Tabelul 1. Medii de cultura utilizate si conditii de incubare pentru cultivarea ciupercii *Claviceps purpurea*
Tabelul 2. Caracterizarea culturii fungale rezultate din fermentatia submersa timp de 7 zile, a tulpinii de *Claviceps purpurea*
Tabelul 3. Timpii de retenție obținuți pentru soluțiile etalon
Tabelul 4. Timpii de retenție obținuți pentru probe
Tabelul 5 – Caracterizarea produsului (fractiuni alcaloid-clavinice rezultate din extractia cloroformica a preparatelor apoase brute obtinute din 4 g miceliu liofilizat)

Exemplul 1

Tulpina de *Claviceps purpurea*, crescută pe mediu solid T2, la 28°C, în varstă de 21 de zile, este cultivată în flacoane Erlenmeyer de 500 rnl cu 100 ml mediu SC100 pentru obținerea inoculului în două faze (2+4 zile), la 24°C si 200 rot/min pe agitator rotativ.

Inoculul obtinut este transferat în 7 l mediu de fermentație, în bioreactor, în procent de 1% biomasă umedă/l mediu de fermentație CS2 sterilizat in prealabil la 121°C/30 min, procesul fiind setat la 200 rot/min, 24°C, aerare de 1 vvm (1 volum aer/volum mediu/min) si presiune a O_2 variabila.

Dupa 7 zile de fermentație cultura este filtrata, miceliul spalat cu apă distilată şi liofilizat (proba F1), în miceliul liofilizat şi lichidul de cultura fiind determinat conținutul alcaloidic total (mg%) după metoda van Urk (Rumpell, 1955), producția obținuta fiind de 16 g miceliu liofilizat/l cultură, conținut alcaloidic total de 23,46 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv de 2,47 mg/100 ml lichid de cultură.

Ulterior se realizează extracția apoasă a unei parți din miceliul liofilizat in raport de 1:10 (4 g miceliu: 40 ml apă distilată) prin mojararea uscată a acestuia, urmată de 2 spălări consecutive a resturilor celulare cu apă distilată. Extractul obtinut este supus extracției şi purificării ulterioare, 40 ml extract micelian este delipidat în pâlnia de separare cu 40 ml hexan. Faza hexanică este îndepărtată iar extractul micelian delipidat este alcalinizat la pH=9,0 cu hidroxid de amoniu 25% sub uşoară agitare. Prin alcalinizare, alcaloizii prezenți în extract sub formă de săruri sunt trecuți în bazele corespunzătoare, extractibile în solvenți organici nepolari. Extractul alcalinizat este ulterior extras de 3 ori succesiv cu cate 40 ml cloroform, în pâlnia de separare. Prezența alcaloizilor de tip agroclavină este controlată prin determinarea spectrului fazei organice, in domeniul 200-400 si masurarea absorbantei probei la 282 nm fata de cloroform. Faza organică (97 ml) este separată şi concentrată la sec sub presiune redusă la 35°C. Se obțin 25 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect onctuos, miros înțepător, neplăcut).

Determinarea calitativă şi semicantitativă a conținutului alcaloidic, in scopul identificarii componentei cu activitate antineoplazica, se face prin cromatografie de lichide de inalta performanta (HPLC), cu fază inversă, in urmatoarele conditii: *Sistem HPLC*: Agilent 1200, cu înregistrarea şi integrarea cromatogramelor prin sistemul computerizat Borwin şi detector sir de diode; Faza staționară: Micropak Amino (250 mm x 2,1 mm; 10 μm); Temperatura coloanei: menținută constant la 20^{0}C; Faza mobilă: *componenta A* = eter; *componenta B* = etanol, in proportie de 80:20 izocrat; Debit: 0.15mL/min; Volumul injectatt: 20 μl soluții de analizat, respectiv standard; Detecție: UV la cinci lungimi de undă diferite (λ = 225, 240, 254, 282 şi 310 nm), pentru probe şi etaloane. Suplimentar pentru fiecare etalon se inregistreaza spectrul de absorbție în intervalul λ = 200 - 400 nm, care sunt folosite pentru comparația cu spectrele picurilor corespunzătoare separate din cromatogramele probelor analizate. Pentru identificarea alcaloizilor (agroclavina si posibil prezenta ergotoxinelor) se utilizeaza ca etaloane agroclavina, ergocristina, ergocornina si ergocriptina (100.4 μg/mL- LGC Standards, Wesel, Germania). Identificarea picurilor se realizeaza atât prin comparația timpilor de retenție din cromatograma probei cu cei ai etaloanelor, cât şi prin compararea spectrelor de absorbție pentru peak-urile obținute cu cele ale etaloanelor analizate în aceleaşi condiții cromatografice.

După optimizarea condițiilor de lucru cromatografice în vederea separării, se injecteaza soluțiile etalon si se determina timpii de retenție pentru aceşti compuşi. Pentru etaloane se înregistreaza si spectrele de absorbție în UV-VIS si cromatogramele sunt folosite în continuare pentru identificarea aceloraşi compuşi în diversele probe. Identificarea si compararea spectrelor probelor cu cel al etalonului s-a facut la aceeasi lungime de unda, 282 nm, care conform datelor din literatura este lungimea la care agroclavina prezinta maximul de absorbtie.

Pentru agroclavina standard, la analiza HPLC se inregistreaza 2 peak-uri corespunzatoare celor 2 stereoizomeri acceptati: agroclavina (TR 12.075) si agroclavina 1 (TR. 14.649). In proba analizata s-a identificat un singur compus, agroclavina. Peakul din proba F1 (TR. 12.040) corespunde agroclavinei standard cu TR 12.075, avand si un spectru comparabil cu cel al acesteia.

După ce identificarea compusului este confirmata după timpul de retenție dar şi spectral, pentru peak-ul obținut se efectuiază calcularea purității peak-ului In cadrul analizei cromatografice de lichide de inalta performanta se urmareste ca peak-urile obtinute sa fie cat mai pure astfel incat identificarea sa fie realizata cu precizie. In acest scop, se selecteaza parametrii metodei pentru ca fiecarui component sa ii corespunda un peak bine definit si simetric. In cadrul analizei noastre in probe s-a identificat un singur compus, dupa cum am mentionat deja, parametrii alesi permitand obtinerea unor peak-uri simetrice. Totodata, puritatea acestora a depasit limita minima admisa. Simetria si puritatea permit obtinerea unui spectru clar care poate fi cu usurinta comparat cu cel al etalonului, astfel incat identificarea sa fie sigura. Factorul de puritate al picului de la minutul 12.040, identificat ca fiind agroclavina are valoarea de de 997,743 (din maxim 1000), toate punctele din spectru luate in calcul (541 din 541) fiind simetrice. Utilizand standardul cu agroclavina de concentratie cunoscuta, se cuantifică 2.6148 mg agroclavina % mg fractiune uscată, ceea ce corepunde la 16,34 mg agroclavina/100 g miceliu liofilizat (69,65% din continutul alcaloidic total al miceliului).

Pentru obtinerea preparatelor clavinice in vederea testarii "*in vitro*" reziduul sec este resolvit in DMSO conc. (10 mg reziduu sec in 0,2 g DMSO), concentratia ajustata la 250 µg/ml si pastrat la 4 – 8°C, in flacoane brune.

Testarea *in vitro* a proprietății citostatice a produsului clavinic, pe culturi de celule neoplazice umane HeLa şi HEp-2p, este realizată pe modele experimentale adecvate, care permit (prin metode biochimice şi citometrice) evidențierea şi dovedirea reproductibilității efectului proteinosintezo- şi mitoinhibitor, de inhibare a dezvoltării culturilor celulare la doza citostatic activă, EC_{50}, de 5 µg/ ml, stabilirea dependenței eficienței farmacodinamice de doza de tratament – ce permite optimizarea limitată a eficienței prin manipularea experimentală a dozelor de tratament

S-a dovedit ca produsul clavinic are, pe lângă efectul citostatic de inhibare a diverselor procese celulare şi un impact citotoxic, inferior ca intensitate efectului citostatic indus, corelat direct proporțional cu doza agentului bioactiv.

Exemplul 2

Tulpina de *Claviceps purpurea*, cultivata pe mediu solid T2, timp de 21 de zile, la 28°C este utilizata pentru prepararea inoculului, in conditiile prezentate la exemplul 1. Cu inoculul obținut se însămânțează (1% biomasa umeda/l mediu

de fermentatie) 7 l mediu de fermentație CS2 adaptat pentru stimularea biosintezei agroclavinei prin cresterea cantitatii de zaharoza la 200g/l, mediu (sterilizat anterior la 121°C/30 min) si adaugarea extractului de drojdii 1% (sterilizat separat) dupa 3 zile de la debutul fermentatiei, de asemenea in scopul simularii biosintezei nucleului ergolinic, dar si a cantitatii totale de biomasa fungica. Conditiile de fermentatie in bioreactor au fost setate la 200 rot/min, 24°C, aerare de 0,5 vvm (0,5 volum aer/volum mediu/min) si presiune a O_2 variabila.

Dupa 7 zile de fermentație cultura este filtrată şi materialul biologic (proba F2) este pregatit în conformitate cu protocolul de la exemplul 1. În condițiile date, se obțin 30 g miceliu liofilizat/l cultură, conținut alcaloidic total de 52,75 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv de 3,68 mg/100 ml lichid de cultura.

Extracția şi purificarea alcaloizilor clavinici se realizează dupa protocolul de la exemplul 1. In aceste conditii, se obțin 40,8 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect onctuos, miros înțepător, neplăcut). Prin analiza HPLC, in cromatograma fracției analizate se evidențiază numai un compus, cu timp de retenție (min) de 12.098. Peak-ul din proba corespunde agroclavinei (etalon: TR 12.075), avand un spectru comparabil cu al acesteia. Factorul de puritate al picului de la minutul 12.098, identificat ca fiind agroclavina, are valoarea de de 997,218. Agroclavina este ulterior cuantificata la 4.1344 mg agroclavina %mg fractiune uscata, ceea ce corespunde la 42,17 mg agroclavina/100 g miceliu liofilizat (79,94% din continutul alcaloidic total al miceliului).

Obtinerea preparatelor clavinice pentru testarea "*in vitro*" se realizează după acelaşi protocol ca la exemplul 1, reziduul sec obținut fiind reluat direct în DMSO (10 mg produs in 0,2 g DMSO) concentratia ajustata la 250 µg/ml si pastrat la 4 – 8°C, in flacoane brune.

Testarea "in vitro" a produsului clavinic duce la obținerea de rezultate similare exemplului 1, pentru confirmarea eficacității produsului.

Exemplul 3

Tulpina de *Claviceps purpurea*, cultivată pe mediu solid T2 timp de 21 de zile, la 28°C este utilizată pentru prepararea inoculului, în conditiile prezentate la exemplul 1. Cu inoculul obținut se insămânțează 7 l mediu de fermentatie CS2, adaptat pentru stimularea biosintezei agroclavinei prin cresterea cantitatii de zaharoza la 200g/l, mediu (sterilizat anterior la 121°C/30 min) asociat cu adaugarea extractului de drojdii numai 0,1% de la inceputul fermentatiei. Procesul de fermentatie in bioreactor este setat la 200 rot/min, 24°C, aerare de 0,5 vvm (0,5 volum aer/volum mediu/min) si presiune a O_2 variabila.

Dupa 7 zile de fermentație cultura este filtrată şi materialul biologic (proba F3) este pregătit în conformitate cu protocolul de la exemplul 1. In conditiile date se obțin 35 g miceliu liofilizat/l cultura, conținut alcaloidic total de 96,14mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv de 3,17mg/100 ml lichid de cultura.

Extracția si purificarea alcaloizilor clavinici se realizează dupa protocolul de la exemplul 1. In aceste condiții, se obțin 54,4 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect onctuos, miros înțepător, neplăcut). Prin analiza HPLC, in cromatograma fractiei analizate se evidențiază numai un compus, cu timp de retenție (min) de 12.019. Peak-ul din proba corespunde agroclavinei (etalon: TR 12.075), avand si un spectru comparabil cu al acesteia. Factorul de puritate al

picului de la minutul 12.019, identificat ca fiind agroclavina, are valoarea de de 998, 693. Agroclavina este ulterior cuantificata la 4.1530 mg, agroclavina % mg fracțiune uscata, ceea ce corespunde la 56,89 mg agroclavina/100 g miceliu liofilizat (58,42% din continutul alcaloidic total al miceliului).

Obținerea preparatelor clavinice pentru testarea „in vitro" si „in vivo" se realizează dupa acelasi protocol ca la exemplul 1, reziduul sec obținut fiind reluat în DMSO (in raport de 10 mg produs in 0,2 g DMSO), concentratia ajustata la 250 µg/ml si pastrat la 4 – 8°C, in flacoane brune.

Testarea „in vitro" a produsului clavinic duce la obținerea de rezultate similare ca la exemplul 1, confirmând eficacitatea produsului şi reproductibilitatea experimentului.

Screeningul preclinic in vivo, complex şi multietapizat, pe modele experimentale adecvate cercetării farmacodinamice, al efectului antineoplazic al produsului clavinic, este realizat pe şobolani albi din rasa Wistar purtători de tumori transplantabile (carcinosarcom Walker 256 sau epiteliom limfotrop Guérin T-8), în varianta lor solidă cu dezvoltare subcutanată. Tratamentul zilnic, intraperitoneal al purtătorilor de tumoră Walker şi respectiv Guérin T- 8 cu produsul clavinic, în doză de 50 µg/kcorp s-a concretizat prin inducerea unor scăderi, semnificative statistic, ale masei tumorale medii, față de greutatea tumorală medie martor. Aceste încărcături tumorale medii permit estimarea unor valori ale indicilor de evaluare (regresie tumorală medie, valoare T/C) a acțiunii antitumorale *in vivo* semnificative din punct de vedere citostatic (față de valorile minime impuse de programele american şi nemțesc de screening preclinic, elaborate în vederea identificării unor noi posibili agenți antitumorali: GTM de 35% şi valoare T/C de 0,54).

S-a dovedit posibilitatea de optimizare a potențialului tumorosupresor al produsului clavinic prin manipularea dozelor sale terapeutice, precum si aprecierea unei semnificative eficiențe oncochimioterapeutice ale acestuia în lumina potențialului antitumoral al metotrexatului, ciclofosfamidei, etopozidului şi 5-fluoruracilului, valorile indicilor de evaluare corespunzătoare noului produs fiind similare celor înregistrate în terapia experimentală cu ciclofosfamidă sau metotrexat şi chiar superioare celor caracteristice tratamentului cu 5-fluorouracil sau etopozid, în condițiile folosirii unor doze de tratament anticanceros experimental mult inferioare celor caracteristice citostaticelor standard, ceea ce sugerează şi o mai bună tolerabilitate a tratamentului, probabil datorită unei toxicități mai reduse.

Screeningul preclinic in vivo este completat de testarea pe animale de companie, cu tumori externe, greu abordabile chirurgical. Produsul este administrat in doze saptamanale de 50 µg/kg masa tumorala (tumori mamare), timp de 10 săptămâni, intratumoral în puncte diferite conduce la reducerea tumorii mamare cu 4,5 cm lungime şi 1,5 cm latime în primele 5 săptămâni de administrare intratumorală zilnică a produsului clavinic. Prin examenul necropsic al tumorilor ablate chirurgical se evidentiaza modificarea consistenței acestora din dure la inițierea experimentelor în moi la finalul experimentului, iar histopatologic se evidențiaza necrozări ale țesutului tumoral şi vacuolizări ale acestuia. Produsul nu are efecte secundare majore, sau reacții secundare importante, nefrotoxicitatea şi hepatotoxicitatea fiind aproape nesesizabile.

Conform clasificării Organizației Mondiale a Sănătății a efectelor toxice acute şi subacute ale unui aplicabil tratament chimioterapic în cele cinci grade de

toxicitate (gradul 0 – gradul 4) hematologică – considerăm că produsul clavinic se încadrează în grupa 1 de toxicitate, ce cuprinde chimioterapice care modifică cu circa 7% valorile numărului mediu de eritrocite circulante, a hemoglobinemiei şi a hematocritului şi respectiv cu circa 13,8% valorile numărului mediu de leucocite circulante (3-3,9 x 10^3/mm^3).

Produsul obţinut conform invenţiei prezintă avantajul potenţării acţiunii sale antitumorale prin manipularea experimentală a dozelor de tratament, imbunătăţirea efectului antineoplazic prin utilizarea unor doze oncochimioterapeutice mult reduse faţă de cele ale unor citostatice de uz clinic si atenuarea simptomatologiei bolii citostatice datorită inducerii unor efecte secundare moderate, mai tolerabile de către organismul animal, produsul clavinic dovedind biocompatibilitatea organismului animal cu oncochimioterapia experimentală clavinică şi buna sa tolerabilitate.

a-2011-01301--
05 -12- 2011

Preparat de tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar şi procedeu de obținere

Revendicari

1. Preparat de tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veteterinar, **caracterizat prin aceea ca** este obținut din miceliul liofilizat al tulpinii de *Claviceps purpurea* cultivată submers într-un mediu de fermentație slab aerat, cu o compozitie adaptata, ce conține zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu şi extract de drojdii drept constituenți principali.

2. Preparat de tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar **conform revendicării 1, caracterizat prin aceea ca**, este prezentat sub forma solvita in DMSO, in concentratie de 0,250 mg alcaloid clavinic/ml.

3. Procedeu de obținere a preparatului cu acțiune antitumorală, de uz veterinar **conform revendicări 1 şi 2, caracterizat prin aceea ca** obtinerea extractului activ presupune in primul rand utilizarea unei tulpini de *Claviceps purpurea*, de tip alcaloidic clavinic, nepigmentata si nesporulata si utilizarea unei compozitii noi, adaptate, a mediului de fermentatie (pe baza de zaharoza - element cheie in biosinteza agroclavinei si sulfat de amoniu *in combinatie* cu extractul de drojdii - precursor in calea metabolica de biosinteza a alcaloizilor ergotici), pentru stimularea biosintezei metabolitului in paralel cu cresterea cantitatii de biomasa miceliana.

4. Procedeu de obținere a preparatului cu acțiune antitumorală, de uz veterinar **conform revendicări 1,2 si 3, caracterizat prin aceea ca** în cadrul fermentatiei, s-a recurs la modularea procesului biosintetic prin cresterea cantitatii de zaharoza (zahar alimentar) de la 100g/l la 200 g/l si introducerea extractului de drojdii in cultura, fie de la inceputul fermentatiei (in doza de 0,1 g/l), fie din ziua a 3-a de fermentație (în doza de 1g/l) în vederea stimulării biosintezei alcaloizilor clavinici, din punct de vedere cantitativ.

5. Procedeu de obținere a preparatului cu acțiune antitumorală, de uz veterinar **conform revendicări 1,2,3 şi 4, caracterizat prin aceea ca** extracția şi purificarea alcaloizilor se realizează în extractul apos obținut din miceliu liofilizat, delipidat cu ajutorul hexanului, avand in vedere continutul lipidic (16 - 18%) al celulelor fungale (care poate interfera cu procesul de extractie si purificare al alcaloizilor), urmata de alcalinizarea extractului la pH=9,0 cu NH_4OH si extracția în trei etape succesive in cloroform, ceea ce asigură o extractie selectiva a alcaloidului clavinic.

a-2011-01301--
05 -12- 2011

Tabelul 1. Medii de cultura utilizate si conditii de incubare pentru cultivarea ciupercii *Claviceps purpurea*

Nutrienti	Mediu de intretinere T2 (g/l)	Mediu inocul SC100 (g/l)	Medii de fermentatie		
			CS2 (g/l) F1	CS2 (g/l) F2	CS2 (g/l) F3
Zaharoza	100	100	100	200	200
Asparagina	10	-	-	-	-
Acid citric	-	10	16	16	16
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	10	10	10
$CaCl_2$	-	-	1,1	1,1	1,1
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1,0	-	-	-	-
KH_2PO_4	0,250	0,5	0,25	0,25	0,25
$MgSO_4.7H_2O$	0,250	0,3	0,25	0,25	0,25
Extract de drojdii	0,1	-	-	0,1	1,0
NaCl	-	10	-	-	-
KCl	0,12	-	0,12	0,12	0,12
$FeSO_4.7H_2O$	0,02	-	0,02	0,02	0,02
$ZnSO_47H_2O$	0,014	-	0,015	0,015	0,015
Agar	20	-	-	-	-
pH initial	5,2	5,5	5,5	5,5	5,5
Gradul de aeratie a culturii in fermentatie			1 vvm	0,5 vvm	0,5 vvm
Temperatura de incubare	28°C	24°C	24°C	24°C	24°C
Agitare (rot/min)	-	200	200	200	200

Tabelul 2. Caracterizarea culturii fungale rezultate din fermentatia submersa timp de 7 zile, a tulpinii de *Claviceps purpurea*

Proba	**Biomasa liofilizata (g/l)**	**Continut alcaloidic total**		**Lipide (g/100 g miceliu liofilizat)**	**pH**
		Miceliu liofilizat (mg/100 g miceliu liofilizat)	**Supernatant (mg/100 ml)**		
F1	16	23,46	2,47	17,66	4,67
F2	30	52,75	3,68	17,11	4,59
F3	35	96,14	3,17	16,42	4,73

Tabelul 3. Timpii de retenție obținuți pentru soluțiile etalon

Nr.crt.	Denumire etalon	Timp de retenție (min)
1	ergocornina	8.910
2	agroclavina	12.075
3	ergocriptina	13.321
4	ergocristina	13.714
5	agroclavina 1	14.649

Tabelul 4. Timpii de retenție obținuți pentru probe

Nr.crt.	Denumire proba	Timp de retenție (min)
1.	**F1**	12.040
2.	**F2**	12.098
3.	**F3**	12.019

Tabelul 5 – Caracterizarea produsului
(fractiuni alcaloid-clavinice rezultate din extractia cloroformica a preparatelor apoase brute obtinute din 4 g miceliu liofilizat)

Proba	**fractiune extractiva (mg)**	**mg agroclavina/ 100 mg fractiune extractiva**	**mg agroclavina/ 100 g miceliu liofilizat**	**aspect**
F1	25,0	2.6148	16,34	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos,miros înțepător
F2	40,8	4.1344	42,17	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător
F 3	54,8	4.1530	56,89	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător

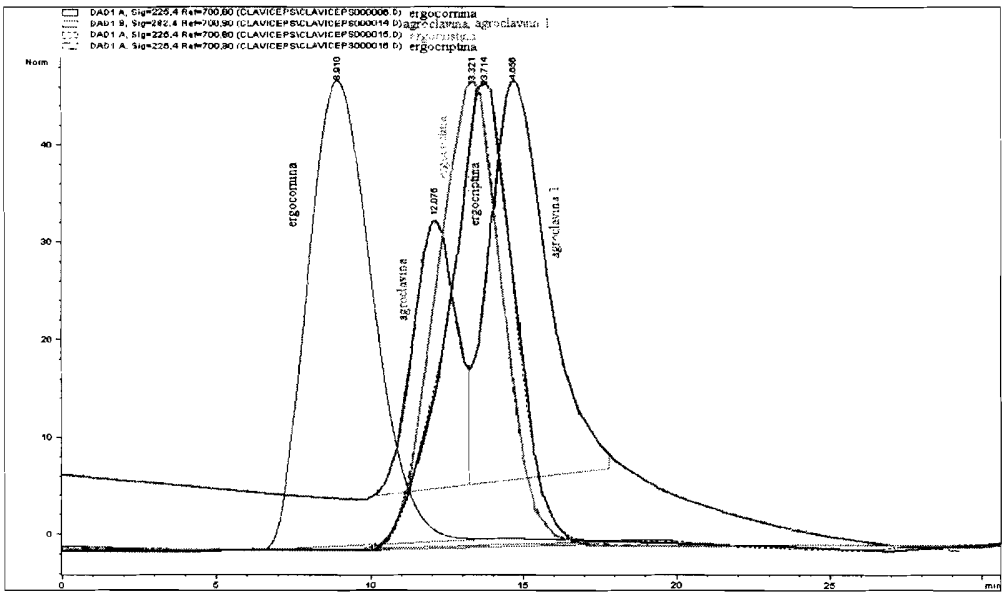

Figura 1. Cromatograma HPLC a amestecului de substanțe etalon

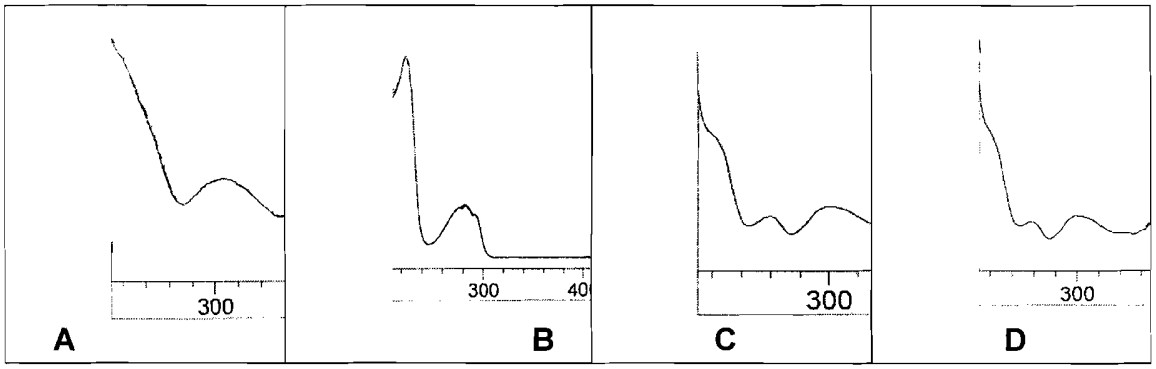

Figura 2. Spectrele de absorbție ale substantelor etalon în domeniul 200 – 400 nm (**A** – acidul ergocorninei ; **B** – agroclavina ; **C** – ergocriptina; **D** – ergocristina)

Figura 3. Formula de calcul pentru cuantificarea componentului din proba

$$Cp = \frac{Ce \times Ap}{Ae}$$

unde:
Cp = concentrația componentului din probă,
Ce = concentrația etalonului,
Ap = aria peak-ului din soluția probă,
Ae = aria etalonului

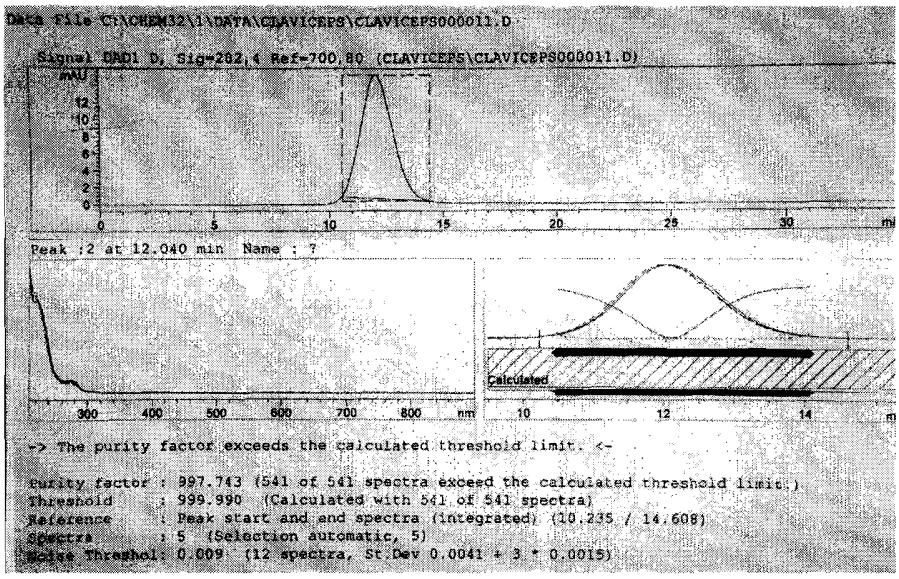

Figura 4. Puritatea peak-ului corespunzator probei F1
(raportul spectral detaliat: semnalul inregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.040 – stanga jos; puritatea si simetria peak-ului – dreapta jos)

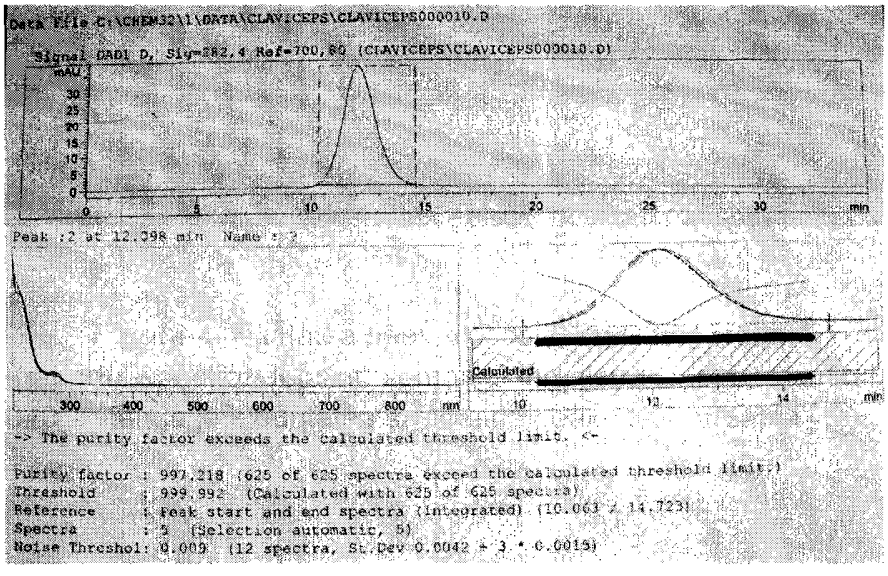

Figura 5. Puritatea peak-ului corespunzator probei F2
(raportul spectral detaliat: semnalul inregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.098 – stanga jos; puritatea si simetria peak-ului – dreapta jos)

RO-2011-01301--
05 -12- 2011

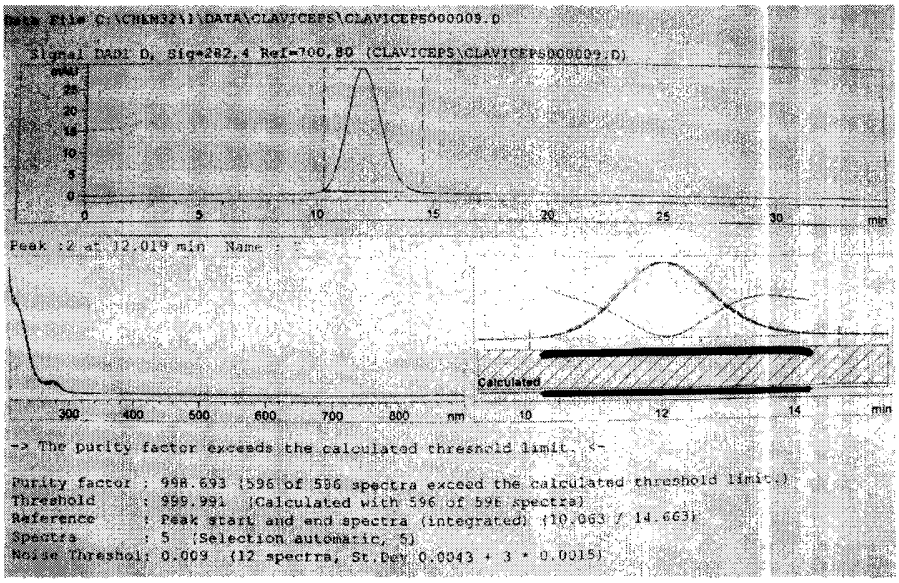

Figura 6. Puritatea peak-ului corespunzator probei F3

(raportul spectral detaliat: semnalul inregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.019 – stanga jos; puritatea si simetria peak-ului – dreapta jos)