



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(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  
IAȘI, FILIALĂ A INCDSB BUCUREȘTI,  
STR. LASCĂR CATARGI NR. 47, IAȘI, IS,  
RO

(72) Inventatori:  
• ROȘU CRĂIȚA MARIA, STR. PĂCURARI  
NR. 18, BL. 3, SC. D, ET. 1, AP. 4, IAȘI, IS,  
RO;  
• ROTINBERG PINCU, STR. ION CREANGĂ  
NR. 73, BL. J 3, SC. B, AP. 9, IAȘI, IS, RO;  
• OLTEANU ZENOVIA, SPLAI BAHLUI  
NR. 29, BL. 5, ET. 3, AP. 14, IAȘI, IS, RO;  
• SURDU ȘTEFANIA, STR. DECEBAL  
NR. 25, BL. Z11, SC. B, ET. 3, AP. 12, IAȘI,  
IS, RO;  
• TRUTA ELENA, STR. ARCU NR. 27,  
BL. L19, AP. 19, IAȘI, IS, RO;

• MIHAI COSMIN TEODOR,  
STR. PĂCURARI NR. 128, BL. 586, SC. A,  
ET. II, AP. 8, IAȘI, IS, RO;  
• HRITCU LUMINIȚA, STR. CODRESCU  
NR. 7C, BL. B3, SC. B, ET. 4, AP. 10, IAȘI,  
IS, RO;  
• GHERGHEL DANIELA, BD. SOCOLA  
NR. 22, BL. T1, AP. 29, IAȘI, IS, RO;  
• HÂNCIANU MONICA,  
STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 16D, IAȘI,  
IS, RO;  
• MIRON ANCA, ALEEA DOMENII NR. 23,  
IAȘI, IS, RO;  
• APROTOSOAIIE ANA CLARA,  
ȘOS. NAȚIONALĂ NR. 76, BL. C4, SC. A,  
ET. 3, AP. 3, IAȘI, IS, RO;  
• CIOANCA OANA,  
STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 6, IAȘI, IS,  
RO

(54) PREPARAT DE TIP CLAVINIC CU ACȚIUNE  
ANTITUMORALĂ, DE UZ VETERINAR ȘI  
PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un preparat de tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Conform invenției, produsul constă dintr-o fracțiune alcaloid clavinică, extrasă din *Claviceps purpurea*, dizolvată în DMSO la o concentrație de 250 mg/ml. Procedeu de obținere a preparatului constă în obținerea unui extract activ din miceliu liofilizat al tulpinii de *Claviceps purpurea*, cultivată submers, într-un mediu de fermentație slab aerat, conținând în principal zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu și extract de drojdie, după care miceliul este extras cu apă, extractul obținut este extras cu hexan, pentru delipidare, și extractul micelian rămas se alcalinizează la  $pH = 9$ , cu hidroxid de amoniu, și alcaloizii bază liberă se extrag cu cloroform, extractele în cloroform se concentrează la sec, rezultând un reziduu uscat gălbui, cu aspect onctuos și miros înțepător, care se dizolvă în DMSO și se păstrează la  $4...5^{\circ}C$ , în flacoane de culoare închisă.

Revendicări: 5  
Figuri: 6

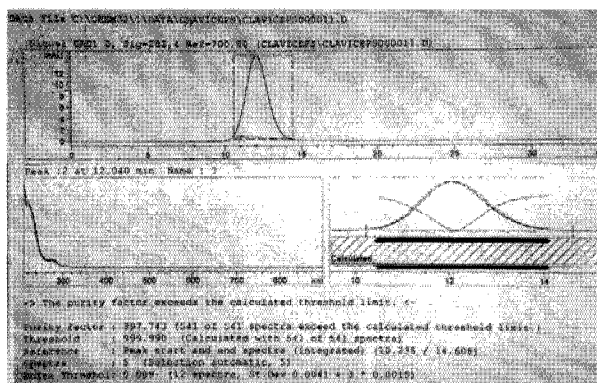
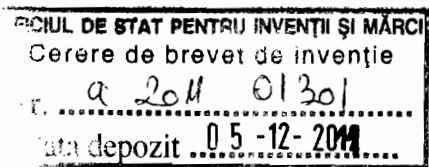


Fig. 4

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





## **Preparat de tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar și procedeu de obținere**

Invenția se referă la un produs medicamentos de uz veterinar, cu acțiune antitumorală, a extractului fungal de tip clavinic (agroclavina) și procedeu de obținere, prin cultivarea submersă a tulpinii de *Claviceps purpurea*.

Sunt cunoscute speciile genului *Claviceps spp.* (Fr.) Tul. (*Hypocreaceae*) ce produc diferite tipuri de alcaloizi ergotici (în principal de tip ergolinic), care au un spectru larg de activități biologice. Agroclavina, alcaloid de tip clavinic (derivati ai dimetilergolinelor), este unul dintre produși, cu proprietăți agoniste D<sub>1</sub>-dopaminei și α<sub>1</sub>-adrenoceptorilor (BERDE, 1984, cf. STAREC et al., 2001), de intensificare a activității celulelor NK (natural killer) și producției de IL-2 (interleukină) și γ-interferon până la concentrații de 10<sup>-7</sup> – 10<sup>-8</sup>M (FISEROVA et al., 1997, Starek et al., 2001) și cu efect vasoconstrictor (Eich et al., 1984).

Agroclavina, festuclavina și unii dintre derivații lor sintetici sunt evidențiați 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 și daunomicinei (EICH et al., 1986; KREN et al., 1997). Clavinele active cauzează „creștere neechilibrată”, o proprietate pe care o împart cu alți agenți citostatici care acționează selectiv, prin inhibarea sintezei ADN-ului, deci a unei interferențe cu starea de organizare a reticulului nuclear (Eich et al., 1986).

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

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

toxicitate pentru organism, cu efecte secundare la nivelul sistemului hemato – poietic si aparatului digestiv, de tipul: leucopenie, trombocitopenie, creșterea 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 reacții adverse.

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

Sunt cunoscute (Z. Rehacek, 1978) procedee de cultivare industrială 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) producătoare de agroclavina si elimoclavina (predominant). Trin M (brevet US4618581/1986) stabilește condițiile de cultivare submersa a tulpinii de *Claviceps fusiformis* nr. 00211. pentru obținerea elimoclavinei, utilizata in tratamentul bolii Parkinson si ca inhibitor a secreției 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 către specii ale genului *Claviceps* spp., printr-un proces de fermentație, in condiții aerobe, pH =5,5 si temperatura de 24<sup>0</sup> C, sursele nutritive si precursorii variind in functie de alcaloidul urmarit, nefiind inasa orientate către prin obținerea 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 acelasii 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 utilizării unora dintre ei consta fie in toxicitatea (dietil-eter) fie in lipsa de selectivitate in extractia alicaloizilor clavinici.

Problema pe care o rezolvă invenția 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 căruia acțiune este verificată prin experimente *in vitro* (pe celule tumorale HeLa) si *in vivo* (pe animale cu tumori induse sau in diferite faze de evoluție), cu eficiența in doze mici (50μg/kg corp) și cu toxicitate redusa, și a procedurii de obținere a produsului cu o compoziție reproductibilă cantitativ și calitativ, în ceea ce privește compoziția mediului de cultura utilizat si timpului de fermentație, cat si metodei de extractie si purificare, cu hexan si cloroform, produsul obtinut (extract clavinic – agroclavina) putând fi utilizat in stare solvita și diluat in momentul utilizării până la doza terapeutică, în cazul injectării intratumorale sau intravenoase.

Preparat cu acțiune antitumorală, de uz veterinar și procedeele de obținere **conform invenției inlatura dezavantajele soluțiilor 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 fermentatie, 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 setati la 200 rot/min, 24°C, aerare de 1 si 0,5 vvm (volum aer/volum mediu/min) si presiune a O<sub>2</sub> 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 hexanica 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 separata, concentrata la sec sub presiune redusa, 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 obtinere a produsului in 3 variante de mediu de cultura diferite, caracterizate prin figurile 1 - 6 si tabelele 1 – 5, reprezentand

**Figura 1.** Cromatograma HPLC a amestecului de substante etalon

**Figura 2.** Spectrele de absorbtie ale substantelor etalon in 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 retentie obtinuti pentru solutiile etalon

**Tabelul 4.** Timpii de retentie obtinuti 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 ml cu 100 ml mediu SC100 pentru obținerea inoculului în două faze (2+4 zile), la 24°C și 200 rot/min pe agitator rotativ.

Inoculul obținut este transferat în 7 l mediu de fermentație, în bioreactor, în procent de 1% biomasă umedă/l mediu de fermentație CS2 sterilizat în 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) și presiune a O<sub>2</sub> variabilă.

Dupa 7 zile de fermentație cultura este filtrată, miceliul spălat cu apă distilată și liofilizat (proba F1), în miceliul liofilizat și lichidul de cultura fiind determinat conținutul alcaloidic total (mg%) după metoda van Urk (Rumpell, 1955), producția obținută 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 părți din miceliul liofilizat în 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 obținut este supus extracției și 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 ușoară 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 câte 40 ml cloroform, în pâlnia de separare. Prezența alcaloizilor de tip agroclavină este controlată prin determinarea spectrului fazei organice, în domeniul 200-400 și măsurarea absorbantei probei la 282 nm fata de cloroform. Faza organică (97 ml) este separată și concentrată la sec sub presiune redusă la 35°C. Se obțin 25 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect onctuos, miros înțepător, neplăcut).

Determinarea calitativă și semicantitativă a conținutului alcaloidic, în scopul identificării componentei cu activitate antineoplazică, se face prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), cu fază inversă, în următoarele condiții: *Sistem HPLC*: Agilent 1200, cu înregistrarea și integrarea cromatogramelor prin sistemul computerizat Borwin și detector sir de diode; Faza staționară: Micropak Amino (250 mm x 2,1 mm; 10 μm); Temperatura coloanei: menținută constant la 20°C; Faza mobilă: *componenta A* = eter; *componenta B* = etanol, în proporție de 80:20 izocrat; Debit: 0.15 mL/min; Volumul injectat: 20 μl soluții de analizat, respectiv standard; Detecție: UV la cinci lungimi de undă diferite (λ = 225, 240, 254, 282 și 310 nm), pentru probe și etaloane. Suplimentar pentru fiecare etalon se înregistrează 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 și posibil prezenta ergotoxinelor) se utilizează ca etaloane agroclavina, ergocristina, ergocornina și ergocriptina (100.4 μg/mL - LGC Standards, Wesel, Germania). Identificarea picurilor se realizează atât prin comparația timpilor de retenție din cromatograma probei cu cei ai etaloanelor, cât și prin compararea spectrelor de absorbție pentru peak-urile obținute cu cele ale etaloanelor analizate în aceleași condiții cromatografice.

După optimizarea condițiilor de lucru cromatografice în vederea separării, se injectează soluțiile etalon și se determină timpurile de retenție pentru acești compuși. Pentru etaloane se înregistrează și spectrele de absorbție în UV-VIS și cromatogramele sunt folosite în continuare pentru identificarea aceluiași compuși în diversele probe. Identificarea și compararea spectrelor probelor cu cel al etalonului s-a făcut la aceeași lungime de undă, 282 nm, care conform datelor din literatura este lungimea la care agroclavina prezintă maximum de absorbție.

Pentru agroclavina standard, la analiza HPLC se înregistrează 2 peak-uri corespunzătoare celor 2 stereoizomeri acceptați: agroclavina (TR 12.075) și agroclavina 1 (TR. 14.649). În proba analizată s-a identificat un singur compus, agroclavina. Peakul din proba F1 (TR. 12.040) corespunde agroclavinei standard cu TR 12.075, având și un spectru comparabil cu cel al acesteia.

După ce identificarea compusului este confirmată după timpul de retenție dar și spectral, pentru peak-ul obținut se efectuează calcularea purității peak-ului. În cadrul analizei cromatografice de lichide de înaltă performanță se urmărește ca peak-urile obținute să fie cât mai pure astfel încât identificarea să fie realizată cu precizie. În acest scop, se selectează parametrii metodei pentru ca fiecărui component să îi corespundă un peak bine definit și simetric. În cadrul analizei noastre în probe s-a identificat un singur compus, după cum am menționat deja, parametrii aleși permitând obținerea unor peak-uri simetrice. Totodată, puritatea acestora a depășit limita minimă admisă. Simetria și puritatea permit obținerea unui spectru clar care poate fi cu ușurință comparat cu cel al etalonului, astfel încât identificarea să fie sigură. Factorul de puritate al picului de la minutul 12.040, identificat ca fiind agroclavina are valoarea de 997,743 (din maximum 1000), toate punctele din spectru luate în calcul (541 din 541) fiind simetrice. Utilizând standardul cu agroclavina de concentrație cunoscută, se cuantifică 2.6148 mg agroclavina % mg fracțiune uscată, ceea ce corespunde la 16,34 mg agroclavina/100 g miceliu liofilizat (69,65% din conținutul alcaloidic total al miceliului).

Pentru obținerea preparatelor clavinice în vederea testării "in vitro" reziduu sec este rezolvit în DMSO conc. (10 mg reziduu sec în 0,2 g DMSO), concentrația ajustată la 250 μg/ml și păstrat la 4 – 8°C, în flacoane brune.

Testarea *in vitro* a proprietății citostatice a produsului clavinic, pe culturi de celule neoplazice umane HeLa și HEP-2p, este realizată pe modele experimentale adecvate, care permit (prin metode biochimice și citometrice) evidențierea și dovedirea reproductibilității efectului proteinosintezo- și mitoinhibitor, de inhibare a dezvoltării culturilor celulare la doza citostatic activă, EC<sub>50</sub>, 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 că produsul clavinic are, pe lângă efectul citostatic de inhibare a diverselor procese celulare și un impact citotoxic, inferior ca intensitate efectului citostatic indus, corelat direct proporțional cu doza agentului bioactiv.

## Exemplul 2

Tulpina de *Claviceps purpurea*, cultivată pe mediu solid T2, timp de 21 de zile, la 28°C este utilizată pentru prepararea inoculului, în condițiile prezentate la exemplul 1. Cu inoculul obținut se însămânțează (1% biomasa umedă/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. Conditiiile 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<sub>2</sub> variabila.

Dupa 7 zile de fermentație cultura este filtrată și materialul biologic (proba F2) este pregătit 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.

Extractia și 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 același protocol ca la exemplul 1, reziduu 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 condițiile prezentate la exemplul 1. Cu inoculul obținut se însămânțează 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<sub>2</sub> variabila.

Dupa 7 zile de fermentație cultura este filtrată și materialul biologic (proba F3) este pregătit în conformitate cu protocolul de la exemplul 1. In condițiile 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.

Extractia 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 și reproductibilitatea experimentului.

Screeningul preclinic in vivo, complex și multietapizat, pe modele experimentale adecvate cercetării farmacodinamice, al efectului antineoplazic al produsului clavinic, este realizat pe șobolani 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 și respectiv Guérin T- 8 cu produsul clavinic, în doză de 50 µg/kgcorp 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 și nemțesc de screening preclinic, elaborate în vederea identificării unor noi posibili agenți antitumorali: GTM de 35% și valoare T/C de 0,54).

S-a dovedit posibilitatea de optimizare a potențialului tumorosupresor al produsului clavinic prin manipularea dozelor sale terapeutice, precum și aprecierea unei semnificative eficiențe oncochimioterapeutice ale acestuia în lumina potențialului antitumoral al metotrexatului, ciclofosfamidei, etopozidului și 5-fluoruracilului, valorile indicilor de evaluare corespunzătoare noului produs fiind similare celor înregistrate în terapia experimentală cu ciclofosamidă sau metotrexat și 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 și 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 tumorală (tumori mamare), timp de 10 săptămâni, intratumoral în puncte diferite conduce la reducerea tumorii mamare cu 4,5 cm lungime și 1,5 cm lațime 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 evidențiază necrozări ale țesutului tumoral și vacuolizări ale acestuia. Produsul nu are efecte secundare majore, sau reacții secundare importante, nefrotoxicitatea și hepatotoxicitatea fiind aproape nesensibile.

Conform clasificării Organizației Mondiale a Sănătății a efectelor toxice acute și 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 și a hematocritului și respectiv cu circa 13,8% valorile numărului mediu de leucocite circulante ( $3-3,9 \times 10^3/\text{mm}^3$ ).

Produsul obținut conform invenției prezintă avantajul potențării acțiunii sale antitumorale prin manipularea experimentală a dozelor de tratament, îmbunătățirea efectului antineoplazic prin utilizarea unor doze oncochimioterapeutice mult reduse față de cele ale unor citostatice de uz clinic și 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 și buna sa tolerabilitate.

## **Preparat de tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar și procedeu de obținere**

### **Revendicari**

1. Preparat de tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, **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 compoziție adaptată, ce conține zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu și 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 în DMSO, în concentrație de 0,250 mg alcaloid clavinic/ml.

3. Procedeu de obținere a preparatului cu acțiune antitumorală, de uz veterinar **conform revendicări 1 și 2, caracterizat prin aceea ca** obținerea extractului activ presupune în primul rând utilizarea unei tulpini de *Claviceps purpurea*, de tip alcaloidic clavinic, nepigmentată și nesporulată și utilizarea unei compoziții noi, adaptate, a mediului de fermentație (pe baza de zaharoză - element cheie în biosinteza agroclavinei și sulfat de amoniu *în combinație* cu extractul de drojdii - precursor în calea metabolică de biosinteza a alcaloizilor ergotici), pentru stimularea biosintezei metabolitului în paralel cu creșterea cantității de biomasa miceliană.

4. Procedeu de obținere a preparatului cu acțiune antitumorală, de uz veterinar **conform revendicări 1,2 și 3, caracterizat prin aceea ca** în cadrul fermentației, s-a recurs la modularea procesului biosintetic prin creșterea cantității de zaharoză (zahăr alimentară) de la 100g/l la 200 g/l și introducerea extractului de drojdii în cultură, fie de la începutul fermentației (în doză de 0,1 g/l), fie din ziua a 3-a de fermentație (în doză 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 și 4, caracterizat prin aceea ca** extracția și purificarea alcaloizilor se realizează în extractul apos obținut din miceliu liofilizat, delipidat cu ajutorul hexanului, având în vedere conținutul lipidic (16 - 18%) al celulelor fungale (care poate interfera cu procesul de extracție și purificare al alcaloizilor), urmata de alcalinizarea extractului la pH=9,0 cu NH<sub>4</sub>OH și extracția în trei etape succesive în cloroform, ceea ce asigură o extracție selectivă a alcaloidului clavinic.

**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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	10	10	10
CaCl <sub>2</sub>	-	-	1,1	1,1	1,1
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,0	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,250	0,5	0,25	0,25	0,25
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02	-	0,02	0,02	0,02
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	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.	<b>F1</b>	12.040
2.	<b>F2</b>	12.098
3.	<b>F3</b>	12.019

**Tabelul 5 – Caracterizarea produsului**  
(fracțiuni alcaloid-clavinice rezultate din extracția cloroformică a preparatelor apoase brute obținute din 4 g miceliu liofilizat)

Proba	fracțiune extractivă (mg)	mg agroclavina/ 100 mg fracțiune extractivă	mg agroclavina/ 100 g miceliu liofilizat	aspect
<b>F1</b>	25,0	2.6148	16,34	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător
<b>F2</b>	40,8	4.1344	42,17	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător
<b>F3</b>	54,8	4.1530	56,89	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător

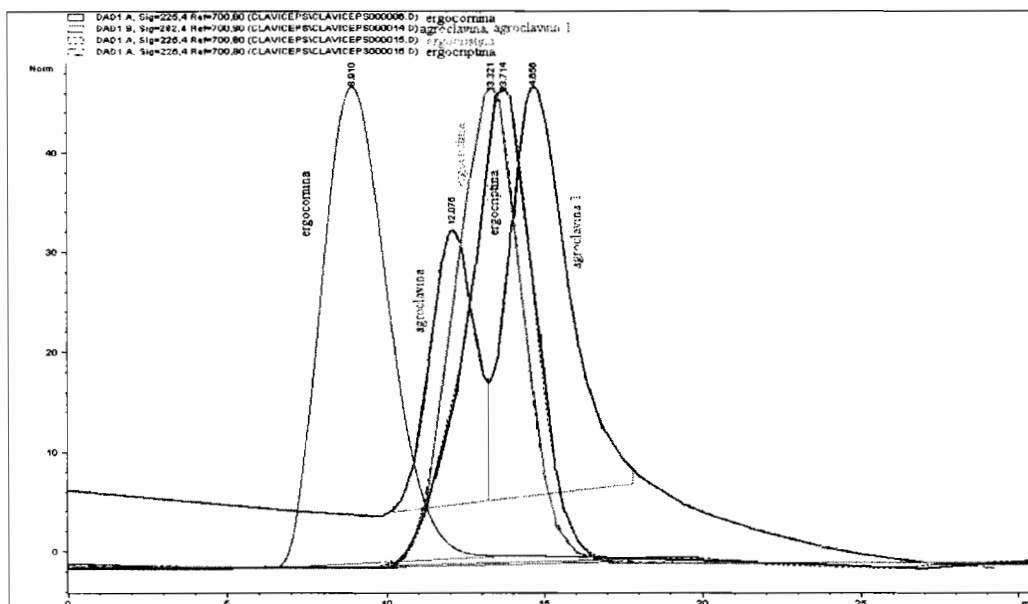


Figura 1. Cromatograma HPLC a amestecului de substanțe etalon

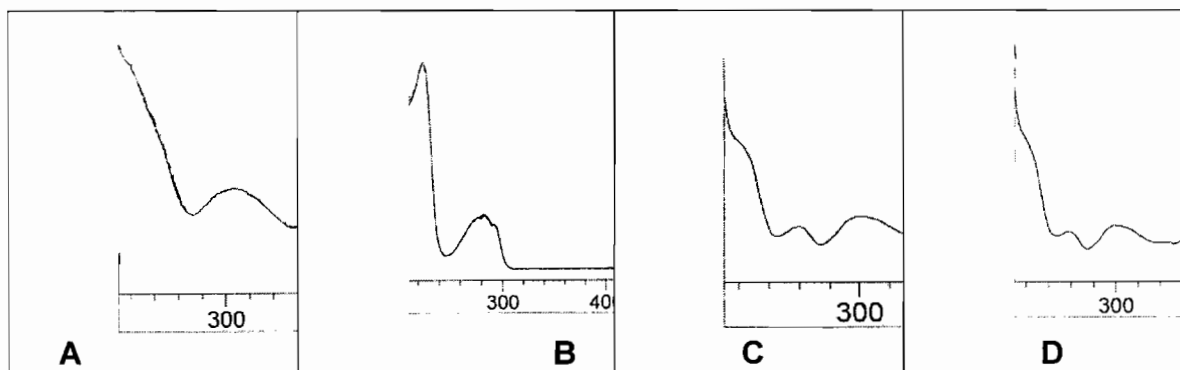


Figura 2. Spectrele de absorbție ale substantelor etalon în domeniul 200 – 400 nm (A – acidul ergocorninei ; B – agroclavina ; C – ergocriptina ; D – ergocristina)

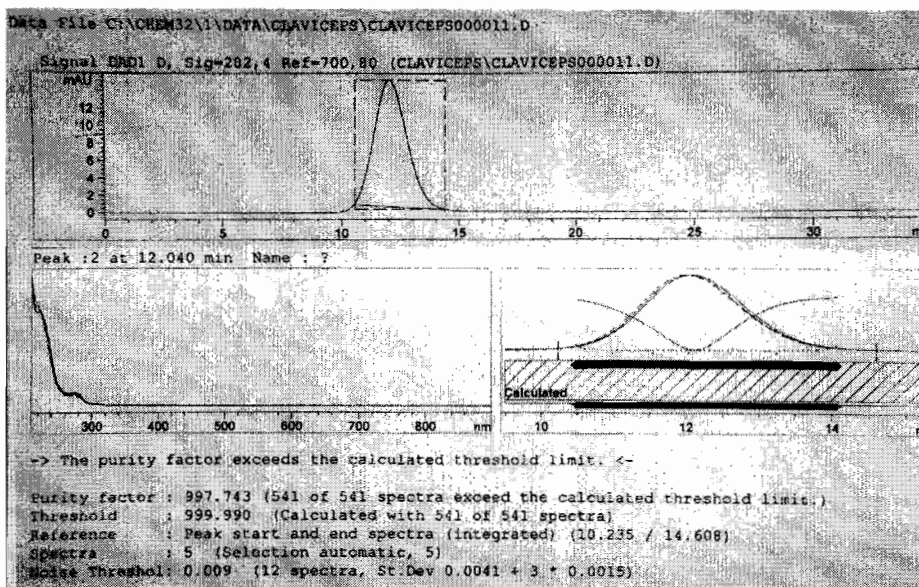
Figura 3. Formula de calcul pentru cuantificarea componentului din proba

$$C_p = \frac{C_e \times A_p}{A_e}$$

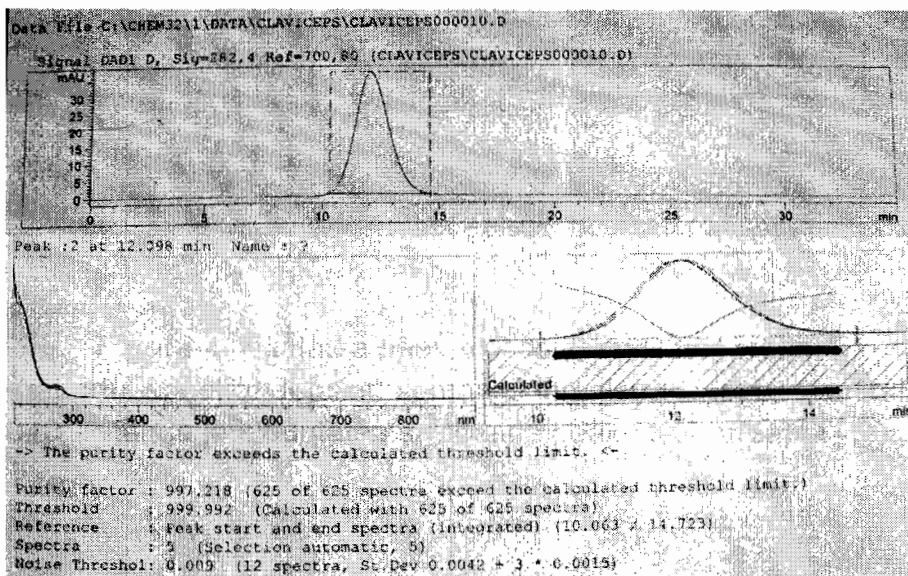
unde:

- C<sub>p</sub> = concentrația componentului din probă,
- C<sub>e</sub> = concentrația etalonului,
- A<sub>p</sub> = aria peak-ului din soluția probă,
- A<sub>e</sub> = aria etalonului

*Am*

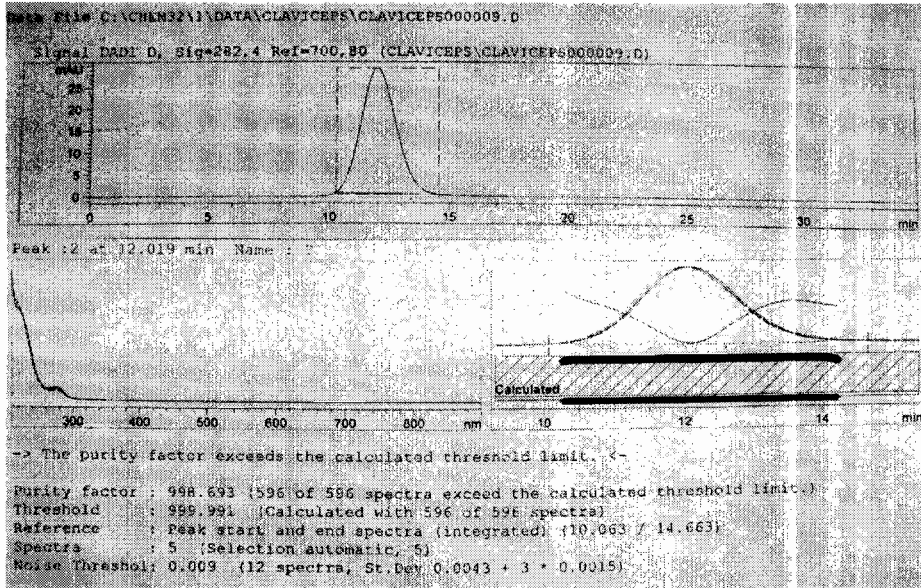


**Figura 4.** Puritatea peak-ului corespunzator probei F1  
(raportul spectral detaliat: semnalul inregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.040 – stanga jos; puritatea si simetria peak-ului – dreapta jos)



**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)

*me*



**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)