



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.12.2014** BOPI nr. **12/2014**

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

(73) Titular:

- **INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE IAȘI, FILIALĂ A INCDSB BUCUREȘTI, STR.LASCĂR CATARGI NR.47, IAȘI, IS, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "GRIGORE T. POPA" DIN IAȘI, STR. UNIVERSITĂȚII NR.16, IAȘI, IS, RO;**
- **UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI, BD.CAROL I NR.11, IAȘI, IS, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI, ALEEA MIHAIL SADOVEANU NR.3, 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, ET.2, 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.Z 11, SC.B, ET.3, AP.12, IAȘI, IS, RO;**

- **TRUȚĂ ELENA, STR.ARCU NR.27, BL.L 19, AP.19, IAȘI, IS, RO;**
- **MIHAI COSMIN TEODOR, STR.PĂCURARI NR.128, BL.586, SC.A, ET.2, AP.8, IAȘI, IS, RO;**
- **HRITCU LUMINIȚA, STR.CODRESCU TEODOR NR.7C, BL.B 3, SC.B, ET.4, AP.10, IAȘI, IS, RO;**
- **GHERGHEL DANIELA, BD.SOCOLA NR.22, BL.T 1, AP.29, IAȘI, IS, RO;**
- **HÂNCIANU MONICA, STR.PROF. EMIL HONORIU NR.16 D, IAȘI, IS, RO;**
- **MIRON ANCA, ALEEA DOMENII NR.23, IAȘI, IS, RO;**
- **APROTOSOAIE ANA CLARA, ȘOS.NAȚIONALĂ NR.76, BL.C 4, SC.A, ET.3, AP.3, IAȘI, IS, RO;**
- **CIOANCA OANA, STR.PROF. EMIL HONORIU NR.6, IAȘI, IS, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- US 4618581 (A); BETTINA KOPP ȘI H. J. REHM, "ALKALOID PRODUCTION BY IMMOBILIZED MYCELIA OF CLAVICEPS PURPUREA", EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY A BIOTECHNOLOGY", VOLUME 18, ISSUE 5, PP 257 - 263, 1983**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PREPARAT DE TIP CLAVINIC ȘI PRODUSUL OBTINUT PRIN ACEST PROCEDEU**



RO 128512 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a unui preparat tip clavinic (agro-
clavina), prin cultivarea submersă a tulpinii de *Claviceps purpurea* și preparatul tip clavinic
3 cu acțiune antitumorală, de uz veterinar.

Sunt cunoscute speciile genului *Claviceps spp.* (Fr.) Tul. (*Hypocreaceae*) ce produc
5 diferite tipuri de alcaloizi ergotici (în principal de tip ergolinic), care au un spectru larg de
activități biologice. Agroclavina, alcaloid de tip clavinic (derivați ai dimetilergolinelor), este
7 unul dintre produșii cu proprietăți agoniste D₁ dopaminei și α₁-adrenoceptorilor (BERDE,
1984, cf. STAREC et al., 2001), de intensificare a activității celulelor NK (natural killer) și
9 producției de IL-2 (interleukină) și γ-interferon până la concentrații de 10⁻⁷...10⁻⁸M
(FISEROVA et al., 1997, Starek et al., 2001) și cu efect vasoconstrictor (Eich et. al, 1984).

11 Agroclavina, festuclavina și unii dintre derivații lor sintetici sunt evidențiați doar
experimental cu efecte antineoplazice, nefiind cunoscute până în prezent produse farmaceutice.
13 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
15 et al., 1997). Clavinele active cauzează „creșterea neechilibrată”, o proprietate pe care o împarte
cu alți agenți citostatici care acționează selectiv, prin inhibarea sintezei ADN-ului, deci a unei
17 interferențe cu starea de organizare a reticulului nuclear (Eich et al., 1986).

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

21 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 hematopoietic și a aparatului digestiv, de tipul:
23 leucopenie, trombocitopenie, creșterea semnificativă a enzimelor hepatice, hipogamma-
globulinemia (Methotrexat), supresia măduvei osoase (Chlorambucil), neutropenie
25 (Cyclophosphamid), scăderea numărului de leucocite sau de plachete (Vincristin), trombo-
citopenie, anemie, cu reducerea clearance-ului creatininei; hipomagnezinemie, hipocalcemie,
27 hipopotasemie; creșterea tranzitorie a transaminazelor serice (Cisplatin), la care se adaugă
numeroase reacții adverse.

29 Pentru producerea la scară industrială a compușilor clavinici de interes farmaceutic
și medical, se utilizează în special tulpini de *Claviceps fusiformis*, *Claviceps paspali* și
31 *Claviceps purpurea*.

Sunt cunoscute (Z. Rehacek, 1978) procedee de cultivare industrială a unor tulpini
33 mutante de *Claviceps purpurea* CP 7/5 CCM F-630 (brevet **CS 204301**), CP7/63 CCM F-631
(brevet **CS 204302**) și CP7/274 CCM F-632 (brevet **204303**) producătoare de agroclavină
35 și elimoclavină (predominant). Trin M (brevet **US 4618581/1986**) stabilește condițiile de
cultivare submersă a tulpinii de *Claviceps fusiformis* nr. 00211, pentru obținerea
37 elimoclavinei, utilizată în tratamentul bolii Parkinson și ca inhibitor a secreției de prolactină
(B. Berde și O. Schild: *Ergot alkaloids and related compounds*; Handb. Exp. Pharm., 49,
39 SpringerVerlag, Berlin, 1978).

41 Aceste brevete au în comun doar biosinteza alcaloizilor clavinici de către specii ale
genului *Claviceps spp.*, printr-un proces de fermentație, în condiții aerobe, pH =5,5 și
temperatura de 24°C, sursele nutritive și precursorii variind în funcție de alcaloidul urmărit,
43 nefiind însă orientate către prin obținerea unui produs agroclavinic de uz farmaceutic.

45 Procesul de extracție, la nivel industrial, a alcaloizilor ergotici, din cultura fungică,
presupune protocoale de lucru care au în comun utilizarea aceluiași grupe de solvenți, cum
ar fi: dietil - eter (**CS 264880**, **CS 264881**), cloroform - alcool izopropilic (**US 4618581**,
47 **US 3884762**), etanol sau metanol (**DP 47315**, **DP 697760**) etc. Dezavantajul utilizării unora
dintre ei constă fie în toxicitatea (dietil-eter), fie în lipsa de selectivitate în extracția alcaloizilor
49 clavinici.

RO 128512 B1

Bettina Kopp, H. J. Rehm, Eur J Microbiol Biotechnol, *Alkaloid production by immobilized mycelia of Claviceps purpurea*, 1983, Volume 18, Issue 5, pp. 257-263, descrie un miceliu de *Claviceps purpurea* CBS 164.59 care produce alcaloizi clavinici și ergometrinici imobilizați în diferite matrice. Aceste micelii au prezentat o sensibilitate ridicată la tratamentul fizic și chimic extrem, și numai o imobilizare moderată în alginat de calciu, și s-au dovedit a fi metoda potrivită pentru a produce cantități mari de alcaloizi.

Problema pe care o rezolvă invenția este un procedeu de obținere a unui biopreparat de natura clavinică, cu origine în tulpina de *Claviceps purpurea*, ca produs natural, cu efect antitumoral și de uz veterinar.

Procedeul de obținere a unui preparat tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, înlătură dezavantajele soluțiilor cunoscute prin aceea că o tulpină de *Claviceps purpurea* de tip alcaloidic clavinic, nepigmentată și nesporulată, se cultivă pe un mediu de fermentație slab aerat, care conține zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu și extract de drojdie, miceliul liofilizat se extrage cu apă, extractul obținut se extrage, în continuare, cu hexan, pentru îndepărtarea lipidelor, iar extractul micelar rămas se alcalinizează la pH=9 cu NH₄OH, și se supune extracției în trei etape succesive în cloroform, ceea ce asigură o extracție selectivă a alcaloidului clavinic care se concentrează la sec, rezultând un reziduu uscat de culoare gălbuie, cu aspect onctuos și miros înțepător, care se diluează în DMSO la o concentrație de 0,250 mg alcaloid clavinic/ml și se păstrează la 4...5°C, în flacoane de culoare închisă.

Preparatul cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, înlătură dezavantajele soluțiilor cunoscute prin aceea că este obținut prin procedeul definit mai sus, sub forma unui solid de culoare gălbuie, cu aspect onctuos și miros înțepător.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- eficiență în doze mici (50 μg/kg corp) și
- toxicitate redusă.

Procedeul de obținere a unui preparat tip clavulanic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, pornește de la o tulpină de *Claviceps purpurea*, crescută pe mediu solid T2, la 28°C, timp de 21 de zile, 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 fiind transferat în 7 l mediu de fermentație, într-un bioreactor în procent de 1% biomasă umedă/l mediu de fermentație CS2 (în 3 variante adaptate după Pazoutova, 1981), parametrii de proces fiind setați la 200 rot/min, 24°C, aerare de 1 și 0,5 vvm (volum aer/volum mediu/min) și presiunea O₂ variabilă, biomasa rezultată după 7 zile de fermentație fiind recoltată, filtrată, spălată cu apă distilată și liofilizată, producția maximă fiind de 35 g miceliu liofilizat/l cultură, conținut alcaloidic total de 96,14 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv, de 3,17mg mg/100 ml lichid de cultură.

Produsul clavinic (concentrație maximă de 4,1530 mg agroclavină/100 mg fracțiune extractivă) este obținut prin extracția apoasă a miceliului liofilizat în raport de 1:10, extractul apos fiind ulterior supus delipidării cu hexan, faza hexanică este 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 organică este separată, concentrată la sec sub presiune redusă, la 35°C, iar produsul final este obținut prin resolvirea fracției uscate în DMSO, concentrația este ajustată la 250 μg/ml și este păstrat la întuneric și la temperatura de 4...8°C.

În continuare se prezintă 3 exemple de obținere a produsului în 3 variante de mediu de cultură diferite, în legătură cu fig. 1...6 și tabelele 1...5, ce reprezintă:

- fig. 1, cromatograma HPLC a amestecului de substanțe etalon;

RO 128512 B1

1 - fig. 2, spectrele de absorbție ale substanțelor etalon în domeniul 200...400 nm (A -
acidul ergocorninei; B - agroclavină ; C - ergocriptină; D - ergocristină);

3 - fig. 3, formula de calcul pentru cuantificarea componentului din probă;

5 - fig. 4, puritatea peak-ului corespunzător probei F1 (raportul spectral detaliat:
semnalul înregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.098 - stânga jos; puritatea și
simetria peak-ului - dreapta jos);

7 - fig. 5, puritatea peak-ului corespunzător probei F2 (raportul spectral detaliat:
semnalul înregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.098 - stânga jos; puritatea și
simetria peak-ului - dreapta jos);

9 - fig. 6, puritatea peak-ului corespunzător probei F3 (raportul spectral detaliat:
semnalul înregistrat - sus; spectrul compusului cu TR 12.019 - stânga jos; puritatea și
simetria peak-ului - dreapta jos).

13 Tabelul 1. Medii de cultură utilizate și condiții de incubare pentru cultivarea ciupercii
Claviceps purpurea.

15 Tabelul 2. Caracterizarea culturii fungale rezultate din fermentația submersă timp de
7 zile a tulpinii de *Claviceps purpurea*.

17 Tabelul 3. Timpii de retenție obținuți pentru soluțiile etalon.

19 Tabelul 4. Timpii de retenție obținuți pentru probe.

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

Exemplul 1

23 Tulpina de *Claviceps purpurea*, crescută pe mediu solid T2, la 28°C, în vârstă 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.

25 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 O₂ variabilă.

29 După 7 zile de fermentație cultura este filtrată, miceliul spălat cu apă distilată și
liofilizat (proba F1), în miceliul liofilizat și lichidul de cultură fiind determinat conținutul
31 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,
33 respectiv, de 2,47 mg/100 ml lichid de cultură.

35 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 două
37 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
39 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,
41 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
43 agroclavină este controlată prin determinarea spectrului fazei organice, în domeniul
200...400, și măsurarea absorbției probei la 282 nm față de cloroform. Faza organică
45 (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).

47 Determinarea calitativă și semicantitativă a conținutului alcaloidic, în scopul
identificării componente cu activitate antineoplazică, se face prin cromatografie de lichide
49 de înaltă performanță (HPLC), cu fază inversă, în următoarele condiții: Sistem HPLC: Agilent
1200, cu înregistrarea și integrarea cromatogramelor prin sistemul computerizat Borwin și

RO 128512 B1

detector șir de diode; Faza staționară: Micropak Amino (250 mm x 2,1 mm; 10 μm); 1
Temperatura coloanei: menținută constant la 20°C; Faza mobilă: *componenta A* = eter; 3
componenta B = etanol, în proporție de 80:20 izocrat; Debit: 0,15 ml/min; Volumul injectat: 3
20 μl soluții de analizat, respectiv, standard; Detecție: UV la cinci lungimi de undă diferite 5
(A = 225, 240, 254, 282 și 310 nm), pentru probe și etaloane. Suplimentar pentru fiecare 5
etalon se înregistrează spectrul de absorbție în intervalul A = 200...400 nm, care sunt folosite 7
pentru comparația cu spectrele picurilor corespunzătoare, separate din cromatogramele 7
probelor analizate. Pentru identificarea alcaloizilor (agroclavină și, posibil, prezența 9
ergotoxinelor), se utilizează ca etaloane agroclavina, ergocristina, ergocornina și ergocriptina 9
(100,4 μg/ml - LGC Standards, Wesel, Germania). Identificarea picurilor se realizează atât 11
prin comparația timpilor de retenție din cromatograma probei cu cei ai etaloanelor, cât și prin 11
compararea spectrelor de absorbție pentru peak-urile obținute cu cele ale etaloanelor 13
analizate în aceleași condiții cromatografice. 13

După optimizarea condițiilor de lucru cromatografice în vederea separării, se 15
injectează soluțiile etalon și se determină timpii de retenție pentru acești compuși. Pentru 15
etaloane se înregistrează și spectrele de absorbție în UV-VIS, și cromatogramele sunt 17
folosite, în continuare, pentru identificarea aceluiași compuși în diversele probe. Identificarea 17
și compararea spectrelor probelor cu cel al etalonului s-au făcut la aceeași lungime de undă, 19
282 nm, care, conform datelor din literatură, este lungimea la care agroclavina prezintă 19
maximul de absorbție.

Pentru agroclavina standard, la analiza HPLC se înregistrează 2 peak-uri corespun- 21
zătoare celor 2 stereoizomeri acceptați: agroclavina (TR 12.075) și agroclavina 1 23
(TR. 14.649). În proba analizată s-a identificat un singur compus, agroclavina. Peak-ul din 23
proba F1 (TR. 12.040) corespunde agroclavinei standard cu TR 12.075, având și un spectru 25
comparabil cu cel al acesteia. 25

După ce identificarea compusului este confirmată după timpul de retenție, dar și 27
spectral, pentru peak-ul obținut se efectuează calcularea purității peak-ului. În cadrul analizei 27
cromatografice de lichide de înaltă performanță se urmărește ca peak-urile obținute să fie 29
cât mai pure, astfel încât identificarea să fie realizată cu precizie. În acest scop, se 29
selectează parametrii metodei pentru ca fiecărui component să îi corespundă un peak bine 31
definit și simetric. În cadrul analizei noastre în probe s-a identificat un singur compus, după 31
cum am menționat deja, parametrii aleși permițând obținerea unor peak-uri simetrice. 33
Totodată, puritatea acestora a depășit limita minimă admisă. Simetria și puritatea permit 33
obținerea unui spectru clar, care poate fi comparat cu ușurință cu cel al etalonului, astfel 35
încât identificarea să fie sigură. Factorul de puritate al peak-ului de la minutul 12.040, 35
identificat ca fiind agroclavină, are valoarea de 997,743 (din maximum 1000), toate punctele 37
din spectru luate în calcul (541 din 541) fiind simetrice. Utilizând standardul cu agroclavina 37
de concentrație cunoscută, se cuantifică 2,6148 mg agroclavină % mg fracțiune uscată, ceea 39
ce corespunde la 16,34 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat (69,65% din conținutul 39
alcaloidic total al miceliului). Pentru obținerea preparatelor clavinice în vederea testării *in* 41
vitro, reziduul sec este rezolvit în DMSO concentrat (10 mg reziduu sec în 0,2 g DMSO), 41
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 43
neoplazice umane HeLa și HEp-2p este realizată pe modele experimentale adecvate, care 45
permit (prin metode biochimice și citometrice) evidențierea și dovedirea reproductibilității 45
efectului proteinosintezo- și mitoinhibitor, de inhibare a dezvoltării culturilor celulare la doza 47
citostatic activă, EC₅₀, de 5 μg/ml, stabilirea dependenței eficienței farmacodinamice de doza 47
de tratament - ce permite optimizarea limitată a eficienței prin manipularea experimentală a 49
dozelor de tratament. 49

RO 128512 B1

1 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
3 indus, corelat direct proporțional cu doza agentului bioactiv.

Exemplul 2

5 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
7 inoculul obținut se însămânțează (1% biomasă umedă/l mediu de fermentație) 7 l mediu de
fermentație CS2, adaptat pentru stimularea biosintezei agroclavinei prin creșterea cantității
9 de zaharoză la 200g/l (mediu sterilizat anterior la 121°C/30 min) și adăugarea extractului de
drojdii 1% (sterilizat separat) după 3 zile de la debutul fermentației, de asemenea, în scopul
11 stimulării biosintezei nucleului ergolinic, dar și al cantității totale de biomasă fungică.
Condițiile de fermentație în bioreactor au fost setate la 200 rot/min, 24°C, aerare de 0,5 vvm
13 (0,5 volum aer/volum mediu/min) și presiune a O₂ variabilă.

După 7 zile de fermentație cultura este filtrată și materialul biologic (proba F2) este
15 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
17 3,68 mg/100 ml lichid de cultură.

Extracția și purificarea alcaloizilor clavinici se realizează după protocolul de la
19 exemplul 1. În aceste condiții, se obțin 40,8 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect
onctuos, miros înțepător, neplăcut). Prin analiza HPLC, în cromatograma fracției analizate
21 se evidențiază numai un compus cu timp de retenție (min) de 12.098. Peak-ul din probă
corespunde agroclavinei (etalon: TR 12.075), având un spectru comparabil cu al acesteia.
23 Factorul de puritate al peak-ului de la minutul 12.098, identificat ca fiind agroclavina, are
valoarea de 997,218. Agroclavina este ulterior cuantificată la 4,1344 mg agroclavină % mg
25 fracțiune uscată, ceea ce corespunde la 42,17 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat (79,94%
din conținutul alcaloidic total al miceliului). Obținerea preparatelor clavince pentru testarea
27 *in vitro* se realizează după același protocol ca la exemplul 1, reziduu sec obținut fiind reluat
direct în DMSO (10 mg produs în 0,2 g DMSO), concentrația este ajustată la 250 μg/ml și
29 este păstrat la 4...8°C, în flacoane brune. Testarea *in vitro* a produsului clavinic duce la
obținerea de rezultate similare exemplului 1, pentru confirmarea eficacității produsului.

Exemplul 3

31 Tulpina de *Claviceps purpurea*, cultivată pe mediu solid T2 timp de 21 de zile, la
33 28°C, este utilizată pentru prepararea inoculului, în condițiile prezentate la exemplul 1. Cu
inoculul obținut se însămânțează 7 l mediu de fermentație CS2, adaptat pentru stimularea
35 biosintezei agroclavinei prin creșterea cantității de zaharoză la 200g/l, mediu (sterilizat
anterior la 121°C/30 min) asociat cu adăugarea extractului de drojdii numai 0,1% de la
37 începutul fermentației. Procesul de fermentație în bioreactor este setat la 200 rot/min, 24°C,
aerare de 0,5 vvm (0,5 volum aer/volum mediu/min) și presiune a O₂ variabilă.

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

43 Extracția și purificarea alcaloizilor clavinici se realizează după protocolul de la
exemplul 1. În aceste condiții, se obțin 54,4 mg reziduu uscat (culoare gălbuie, aspect
45 onctuos, miros înțepător, neplăcut). Prin analiza HPLC, în cromatograma fracției analizate
se evidențiază numai un compus cu timp de retenție (min) de 12.019. Peak-ul din probă
47 corespunde agroclavinei (etalon: TR 12.075), având și un spectru comparabil cu al acesteia.
Factorul de puritate al peak-ului de la minutul 12.019, identificat ca fiind agroclavina, are
49 valoarea de 998,693. Agroclavina este ulterior cuantificată la 4,1530 mg, % mg fracțiune
uscată de agroclavină, ceea ce corespunde la 56,89 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat

RO 128512 B1

(58,42% din conținutul alcaloidic total al miceliului). Obținerea preparatelor clavinice pentru testarea *in vitro* și *in vivo* se realizează după același protocol ca la exemplul 1, reziduu sec obținut fiind reluat în DMSO (în raport de 10 mg produs în 0,2 g DMSO), concentrația ajustată la 250 μg/ml, și păstrat la 4...8°C, în flacoane brune. 1
3

Testarea *in vitro* a produsului clavinic duce la obținerea de rezultate similare ca la exemplul 1, confirmând eficacitatea produsului și reproductibilitatea experimentului. 5

Screeningul preclinic *in vivo*, complex și multietapizat, pe modele experimentale adecvate cercetării farmacodinamice, a efectului antineoplazic al produsului clavinic este realizat pe șobolani albi din rasa Wistar, purtători de tumori transplantabile (carcinosarcom Walker 256 sau epiteliom limfotrop Guerin T-8), în varianta lor solidă, cu dezvoltare subcutanată. Tratamentul zilnic, intraperitoneal al purtătorilor de tumoră Walker și, respectiv, Guerin T-8 cu produsul clavinic, în doză de 50 μg/kg corp, 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). 7
9
11
13
15
17

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. 19
21
23
25
27

Screeningul preclinic *in vivo* este completat de testarea pe animale de companie, cu tumori externe, greu abordabile chirurgical. Produsul este administrat în doze săptămânale de 50 μg/kg masă 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 lățime în primele 5 săptămâni de administrare intratumorală zilnică a produsului clavinic. Prin examenul de necropsie al tumorilor ablate chirurgical se evidențiază 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. 29
31
33
35
37

Conform clasificării Organizației Mondiale a Sănătății a efectelor toxice acute și subacute ale unui aplicabil tratament chimioterapie 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 astfel 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 ($3...3,9 \times 10^3/\text{mm}^3$). 39
41
43

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. 45
47
49

RO 128512 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a unui preparat tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, **caracterizat prin aceea că** o tulpină de *Claviceps purpurea* de tip alcaloidic clavinic, nepigmentată și nesporulată, se cultivă pe un mediu de fermentație slab aerat, care conține zaharoză, acid citric, sulfat de amoniu și extract de drojdie, miceliul liofilizat se extrage cu apă, extractul obținut se extrage, în continuare, cu hexan, pentru îndepărtarea lipidelor, iar extractul micelar rămas se alcalinizează la pH=9 cu NH₄OH, și se supune extracției în trei etape succesive în cloroform, ceea ce asigură o extracție selectivă a alcaloidului clavinic care se concentrează la sec, rezultând un reziduu uscat de culoare gălbuie, cu aspect onctuos și miros înțepător, care se diluează în DSMO la o concentrație de 0,250 mg alcaloid clavinic/ml și se păstrează la 4...5°C în flacoane de culoare închisă.

11

13

2. Procedeu de obținere a preparatului conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** respectiva cantitate de zaharoză introdusă crește de la 100 g/l la 200 g/l, iar cantitatea de extract de drojdii introdusă în cultură este fie în doză de 0,1 g/l, la începutul fermentației, sau în doză de 1 g/l, în ziua a 3-a de fermentație.

15

17

3. Preparat tip clavinic cu acțiune antitumorală, de uz veterinar, obținut prin procedeul definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este obținut sub forma unui solid de culoare gălbuie, cu aspect onctuos și miros înțepător.

19

Tabelul 1

Medii de cultură utilizate și condiții de incubare pentru cultivarea ciupercii *Claviceps purpurea*

Nutrienți	Mediu de întreținere T2 (g/l)	Mediu inocul SC100 (g/l)	Medii de fermentație		
			CS2 (g/l) F1	CS2 (g/l) F2	CS2 (g/l) F3
Zaharoză	100	100	100	200	200
Asparagină	10	-	-	-	-
Acid citric	-	10	16	16	16
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	10	10	10
CaCl ₂	-	-	1,1	1,1	1,1
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,0	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	0,250	0,5	0,25	0,25	0,25
MgSO ₄ ·7H ₂ 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 ₄ ·7H ₂ O	0,02	-	0,02	0,02	0,02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,014	-	0,015	0,015	0,015
Agar	20	-	-	-	-
pH inițial	5,2	5,5	5,5	5,5	5,5
Gradul de aeratie a culturii în fermentație			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 fermentația submersă timp de 7 zile, a tulpinii de *Claviceps purpurea*

Proba	Biomasă liofilizată (g/l)	Conținut alcaloidic total		Lipide (g/100g miceliu liofilizat)	pH
		Miceliu liofilizat (mg/100g miceliu liofilizat)	Supernatant (mg/100ml)		
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	ergocomină	8.910
2	agroclavină	12.075
3	ergocriptină	13.321
4	ergocristină	13.714
5	agroclavina 1	14.649

RO 128512 B1

Tabelul 4

Timpii de retenție obținuți pentru probe

Nr. crt.	Denumire probă	Timp de retenție (min)
1.	F1	12.040
2.	F2	12.098
3.	F3	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 agroclavină/ 100 mg fracțiune extractivă	mg agroclavină/ 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
F3	54,8	4,1530	56,89	culoare gălbuie, aspect vâscos, onctuos, miros înțepător

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01),

C12N 1/38 (2006.01),

C12N 15/00 (2006.01)

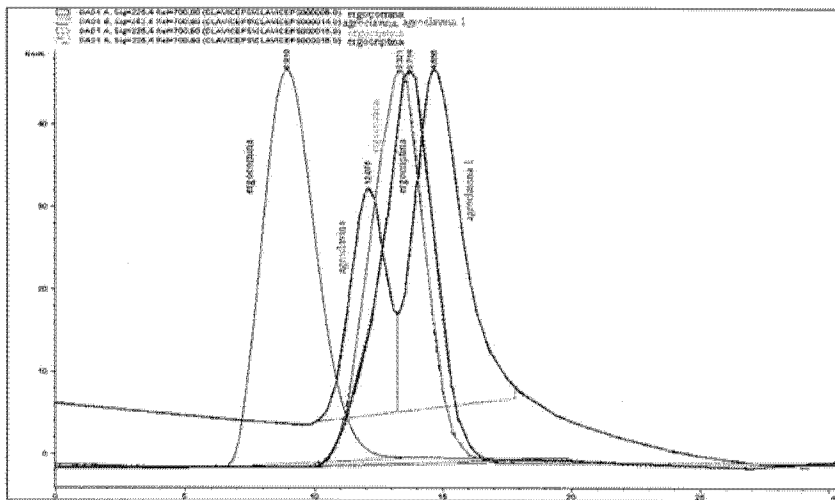


Fig. 1

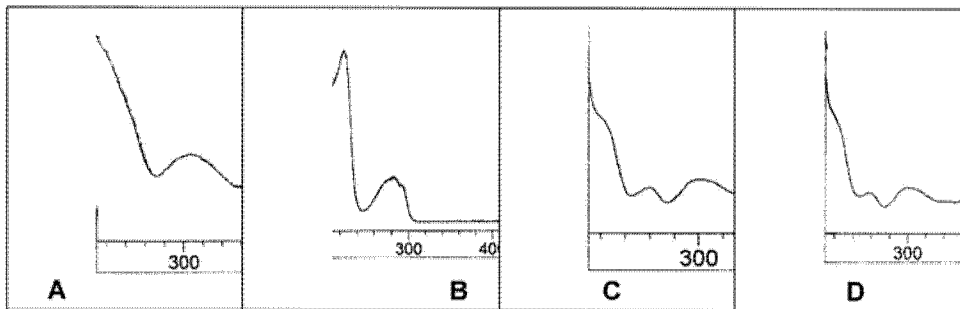


Fig. 2

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

Fig. 3

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01);

C12N 1/38 (2006.01);

C12N 15/00 (2006.01)

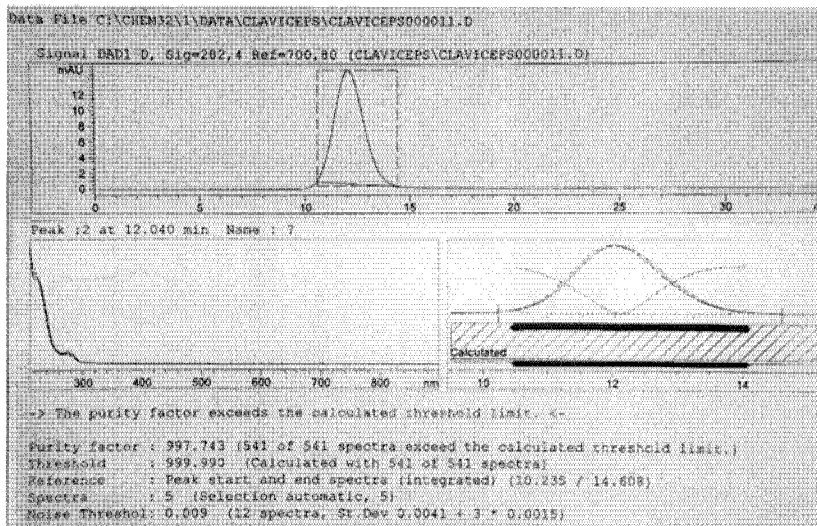


Fig. 4

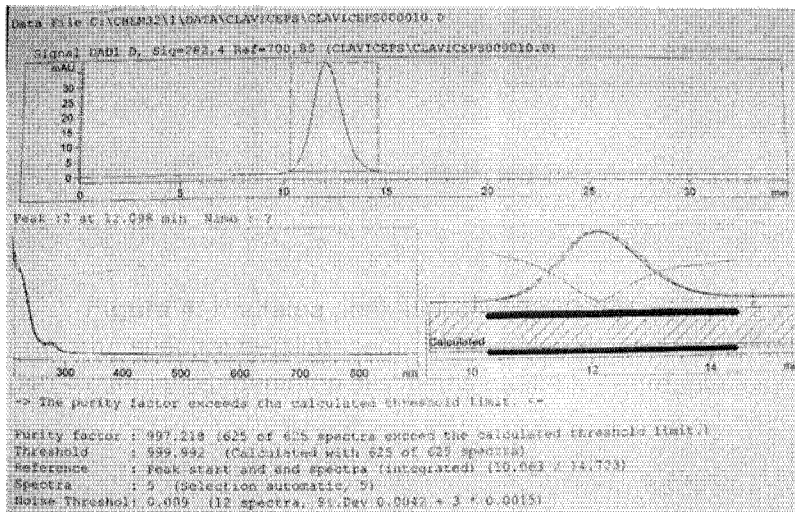


Fig. 5

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01),

C12N 1/38 (2006.01),

C12N 15/00 (2006.01)

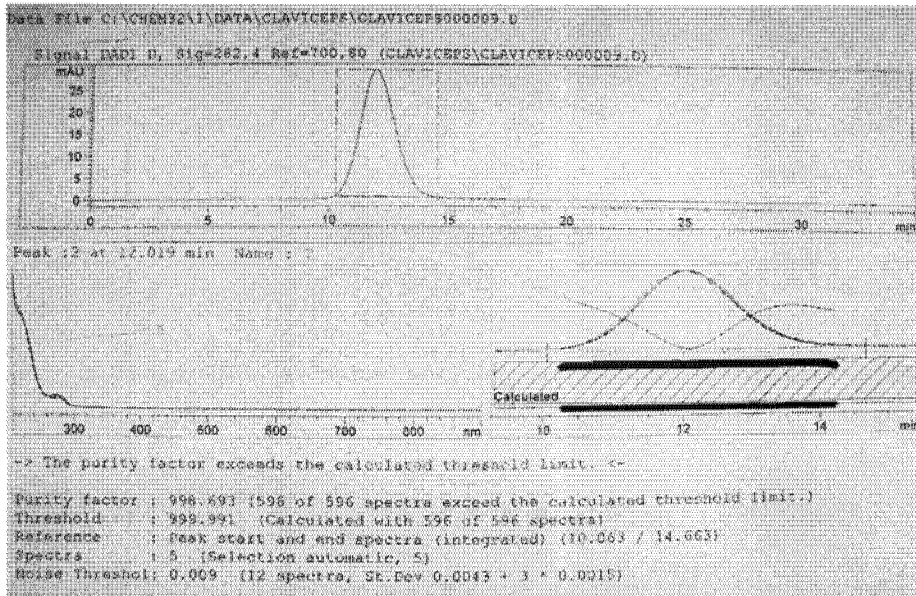


Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 845/2014