

ROMÂNIA



DUPLICAT

ELIBERAT COTITULARULUI  
BREVETULUI DE INVENȚIE  
NR. 128512

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI

# Brevet de invenție

## Nr. 128512

Acordat în temeiul Legii nr.64/1991 privind brevetele de invenție, republicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr.613, din 19 august 2014.

**Titular:** INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE IAȘI, FILIALĂ A INCDSB BUCUREȘTI, IAȘI, IS, RO; UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "GRIGORE T. POPA" DIN IAȘI, IAȘI, IS, RO; UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI, IAȘI, IS, RO; UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ "ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI, IAȘI, IS, RO

**Titlul invenției:** PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PREPARAT DE TIP CLAVINIC ȘI PRODUSUL OBTINUT PRIN ACEST PROCEDEU

**Inventatori:** ROȘU CRĂIȚA MARIA, IAȘI, IS, RO; ROTINBERG PINCU, IAȘI, IS, RO; OLTEANU ZENOVIA, IAȘI, IS, RO; SURDU ȘTEFANIA, IAȘI, IS, RO; TRUȚA ELENA, IAȘI, IS, RO; MIHAI COSMIN TEODOR, IAȘI, IS, RO; HRITCU LUMINIȚA, IAȘI, IS, RO; GHERGHEL DANIELA, IAȘI, IS, RO; HANCIANU MONICA, IAȘI, IS, RO; MIRON ANCA, IAȘI, IS, RO; APROTOSOAIIE ANA CLARA, IAȘI, IS, RO; CIOANCA OANA, IAȘI, IS, RO

Descrierea invenției, revendicările și desenele la care se face referință în acestea, fac parte integrantă din prezentul brevet de invenție.  
Durata brevetului de invenție este de 20 ani, cu începere de la data de 05.12.2011, cu condiția plății taxelor anuale de menținere în vigoare a brevetului.

Confirm cele de mai sus prin  
semnarea și aplicarea sigilului  
Director General

București, Data eliberării 30.12.2014



(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 BĂHLUI 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**

Examinator: biochimist EREMA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui preparat tip clavinic (agro-  
 3 clavina), prin cultivarea submersă a tulpinii de *Claviceps purpurea* și preparatul tip clavinic  
 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 D<sub>1</sub> dopaminei și  $\alpha_1$ -adrenoceptorilor (BERDE,  
 1984, cf. STAREC et al., 2001), de intensificare a activității celulelor NK (natural killer) și  
 9 producției de IL-2 (interleukină) și  $\gamma$ -interferon până la concentrații de  $10^{-7}$ ... $10^{-8}$ M  
 (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 reticulumului 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  
 23 efecte secundare la nivelul sistemului hematopoietic și a aparatului digestiv, de tipul:  
 leucopenie, trombocitopenie, creșterea semnificativă a enzimelor hepatice, hipogamma-  
 25 globulinemia (Methotrexat), supresia măduvei osoase (Chlorambucil), neutropenie  
 (Cyclophosphamid), scăderea numărului de leucocite sau de plachete (Vincristin), trombo-  
 27 citopenie, anemie, cu reducerea clearance-ului creatininei; hipomagnezinemie, hipocalcemie,  
 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  
 43 temperatura de 24°C, sursele nutritive și precursorii variind în funcție de alcaloidul urmărit,  
 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  
 47 ar fi: dietil - eter (**CS 264880**, **CS 264881**), cloroform - alcool izopropilic (**US 4618581**,  
**US 3884762**), etanol sau metanol (**DP 47315**, **DP 697760**) etc. Dezavantajul utilizării unora  
 49 dintre ei constă fie în toxicitatea (dietil-eter), fie în lipsa de selectivitate în extracția alcaloizilor  
 clavinici.

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  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 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  $\mu\text{g/kg}$  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  $\text{O}_2$  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 3,17 mg 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 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  $\mu\text{g/ml}$  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;

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

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

- 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);

- 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);

- 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).

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

Tabelul 2. Caracterizarea culturii fungale rezultate din fermentația submersă 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 (fracțiuni alcaloid-clavinice rezultate din extracția cloroformică a preparatelor apoase brute obținute din 4 g miceliu liofilizat).

#### Exemplul 1

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.

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.

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 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 două 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 absorbției probei la 282 nm față 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 componente 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 şir de diode; Faza staţionară: Micropak Amino (250 mm x 2,1 mm; 10 µm); Temperatura coloanei: menţinută constant la 20°C; Faza mobilă: *componenta A* = eter; *componenta B* = etanol, în proporţie de 80:20 izocrat; Debit: 0,15 ml/min; Volumul injectat: 20 µl soluţii de analizat, respectiv, standard; Detecţie: UV la cinci lungimi de undă diferite (A = 225, 240, 254, 282 şi 310 nm), pentru probe şi etaloane. Suplimentar pentru fiecare etalon se înregistrează spectrul de absorbţie în intervalul A = 200...400 nm, care sunt folosite pentru comparaţia cu spectrele picurilor corespunzătoare, separate din cromatogramele probelor analizate. Pentru identificarea alcaloizilor (agroclavină şi, posibil, prezenţa ergotoxinelor), se utilizează ca etaloane agroclavina, ergocristina, ergocornina şi ergocriptina (100,4 µg/ml - LGC Standards, Wesel, Germania). Identificarea picurilor se realizează atât prin comparaţia timpilor de retenţie din cromatograma probei cu cei ai etaloanelor, cât şi prin compararea spectrelor de absorbţie pentru peak-urile obţinute cu cele ale etaloanelor analizate în aceleaşi condiţii cromatografice.

După optimizarea condiţiilor de lucru cromatografice în vederea separării, se injectează soluţiile etalon şi se determină timpii de retenţie pentru aceşti compuşi. Pentru etaloane se înregistrează şi spectrele de absorbţie în UV-VIS, şi cromatogramele sunt folosite, în continuare, pentru identificarea aceluiaşi compuşi în diversele probe. Identificarea şi compararea spectrelor probelor cu cel al etalonului s-au făcut la aceeaşi lungime de undă, 282 nm, care, conform datelor din literatură, este lungimea la care agroclavina prezintă maximul de absorbţie.

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

După ce identificarea compusului este confirmată după timpul de retenţie, dar şi spectral, pentru peak-ul obţinut se efectuează calcularea purităţii peak-ului. În cadrul analizei cromatografice de lichide de înaltă performanţă se urmăreşte ca peak-urile obţinute 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 şi simetric. În cadrul analizei noastre în probe s-a identificat un singur compus, după cum am menţionat deja, parametrii aleşi permiţând obţinerea unor peak-uri simetrice. Totodată, puritatea acestora a depăşit limita minimă admisă. Simetria şi puritatea permit obţinerea unui spectru clar, care poate fi comparat cu uşurinţă cu cel al etalonului, astfel încât identificarea să fie sigură. Factorul de puritate al peak-ului de la minutul 12.040, identificat ca fiind agroclavină, 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 concentraţie cunoscută, se cuantifică 2,6148 mg agroclavină % mg fracţiune uscată, ceea ce corespunde la 16,34 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat (69,65% din conţinutul alcaloidic total al miceliului). Pentru obţinerea preparatelor clavinice în vederea testării *in vitro*, reziduu sec este rezolvit în DMSO concentrat (10 mg reziduu sec în 0,2 g DMSO), concentraţia ajustată la 250 µg/ml şi păstrat la 4...8°C, în flacoane brune.

Testarea *in vitro* a proprietăţii 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) evidenţierea şi dovedirea reproductibilităţii efectului proteinosinteze- şi mitoinhibitor, de inhibare a dezvoltării culturilor celulare la doza citostatic activă, EC<sub>50</sub>, de 5 µg/ml, stabilirea dependenţei eficienţei farmacodinamice de doza de tratament - ce permite optimizarea limitată a eficienţei 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% biomasă umedă/l mediu de fermentație) 7 l mediu de fermentație CS2, adaptat pentru stimularea biosintezei agroclavinei prin creșterea cantității 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 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 (0,5 volum aer/volum mediu/min) și presiune a O<sub>2</sub> variabilă.

După 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 cultură.

Extracția și purificarea alcaloizilor clavinici se realizează după protocolul de la 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 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. 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 fracțiune uscată, ceea ce corespunde la 42,17 mg agroclavină/100 g miceliu liofilizat (79,94% din conținutul alcaloidic total al miceliului). Obținerea 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 în 0,2 g DMSO), concentrația este ajustată la 250 μg/ml și 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

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 fermentație CS2, adaptat pentru stimularea 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 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 O<sub>2</sub> variabilă.

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 liofilizat/l cultură, conținut alcaloidic total de 96,14 mg/100 g miceliu liofilizat, respectiv, de 3,17 mg/100 ml lichid de cultură.

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 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 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 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

(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, reziduul 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.

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, 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).

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 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 nesesizabile.

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 ( $3...3,9 \times 10^3/\text{mm}^3$ ).

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.

## Revendicări

- 1
- 3
- 5
- 7
- 9
- 11
- 13
- 15
- 17
- 19
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 NH<sub>4</sub>OH, 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.
  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.
  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.

Tabelul 1

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

| Nutrienți                                            | Mediu de<br>întreținere<br>T2<br>(g/l) | Mediu<br>inocul<br>SC100<br>(g/l) | Medii de fermentație |                    |                    |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
|                                                      |                                        |                                   | CS2<br>(g/l)<br>F1   | CS2<br>(g/l)<br>F2 | CS2<br>(g/l)<br>F3 |
| Zaharoză                                             | 100                                    | 100                               | 100                  | 200                | 200                |
| Asparagină                                           | 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 inițial                                           | 5,2                                    | 5,5                               | 5,5                  | 5,5                | 5,5                |
| Gradul de aerație a culturii în<br>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<br>liofilizată<br>(g/l) | Conținut alcaloidic total                             |                          | Lipide<br>(g/100g<br>miceliu<br>liofilizat) | pH   |
|-------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|------|
|       |                                 | Miceliu liofilizat<br>(mg/100g miceliu<br>liofilizat) | Supernatant<br>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        | ergocornină     | 8.910                  |
| 2        | agroclavină     | 12.075                 |
| 3        | ergocriptină    | 13.321                 |
| 4        | ergocristină    | 13.714                 |
| 5        | agroclavina 1   | 14.649                 |

Timpii de retenție obținuți pentru probe

Tabelul 4

| Nr. crt. | Denumire probă | Timp de retenție (min) |
|----------|----------------|------------------------|
| 1.       | F1             | 12.040                 |
| 2.       | F2             | 12.098                 |
| 3.       | F3             | 12.019                 |

Caracterizarea produsului

Tabelul 5

(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)

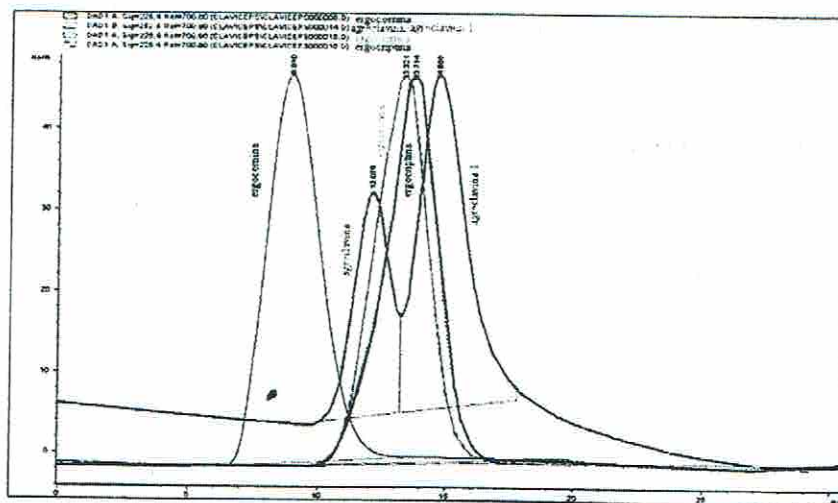


Fig. 1

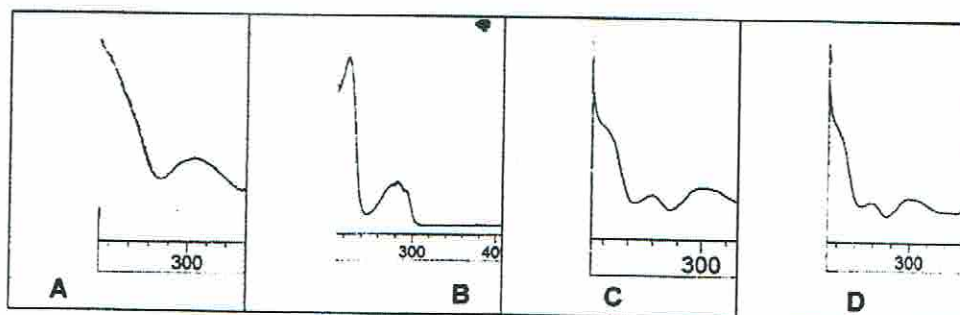


Fig. 2

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

Fig. 3

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01),

C12N 1/38 (2006.01),

C12N 15/00 (2006.01)

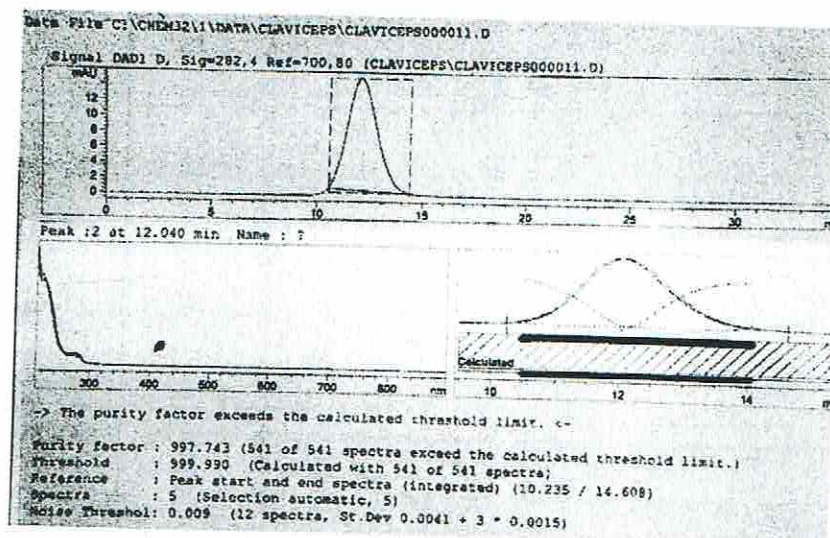


Fig. 4

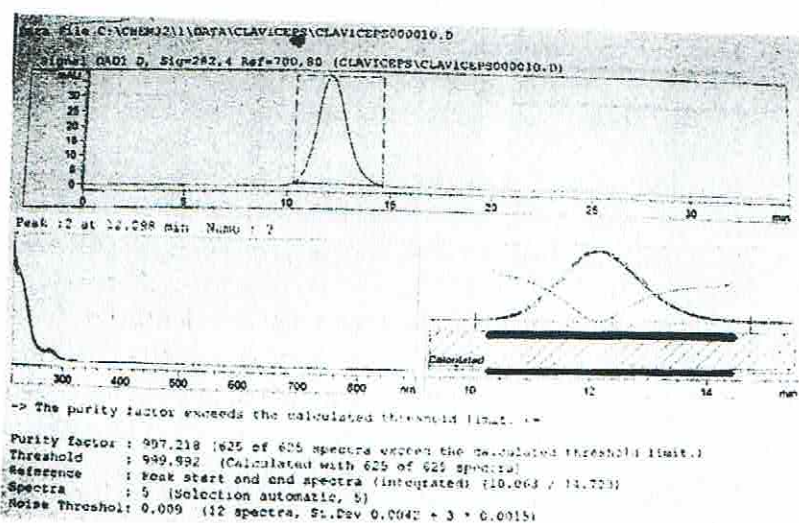


Fig. 5

6.01),  
6.01),  
106.01)

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01),

C12N 1/38 (2006.01),

C12N 15/00 (2006.01)

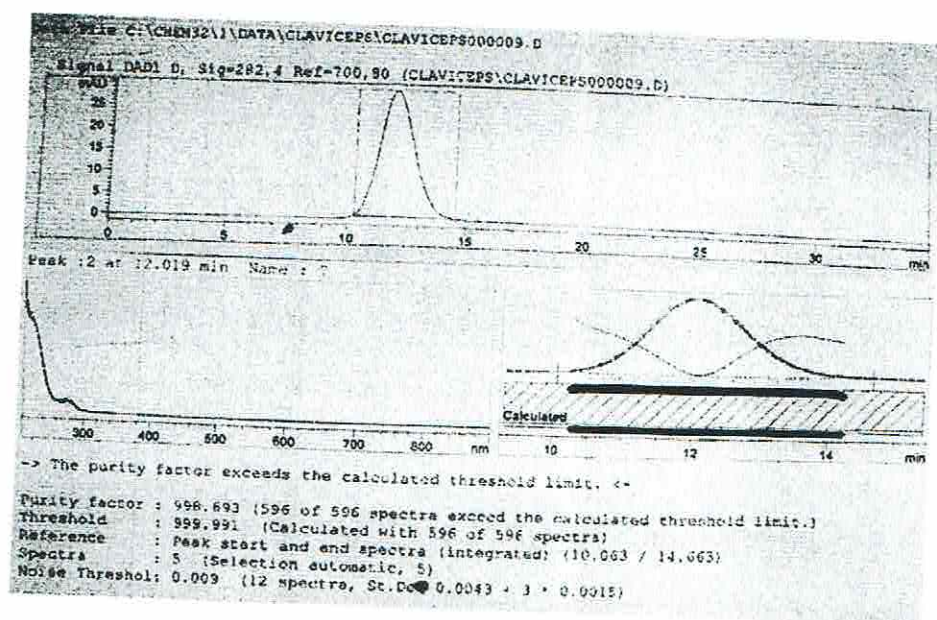


Fig. 6



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