



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(11) 735154

(61) Дополнительный к патенту -

(22) Заявлено 18.04.78 (21) 2606999/28-13

(23) Приоритет - (32) 19.04.77

(31) 16096/77 (33) Великобритания

(51) М. Кл.²

A 61 K 31/48
C 12 D 13/00

Опубликовано 15.05.80. Бюллетень № 18

(53) УДК 678.044.29
(088.8)

Дата опубликования описания 20.04.80

(72) Авторы
изобретения

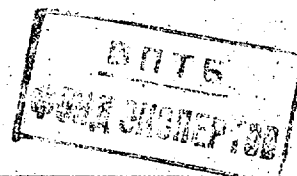
Иностранцы

Энцо Бикко, Мария Луиза Бьянчи, Анаклето Мингетти
и Челестино Спалла
(Италия)

(71) Заявитель

Иностранная фирма

"Социета Фармасьютичи Италия С.п.а."
(Италия)



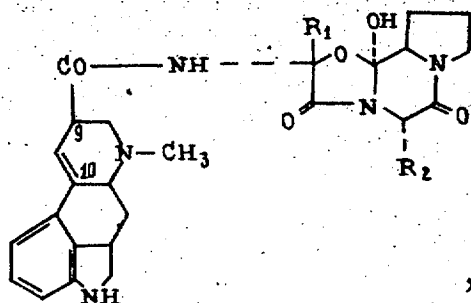
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ СПОРЫНЬИ

1

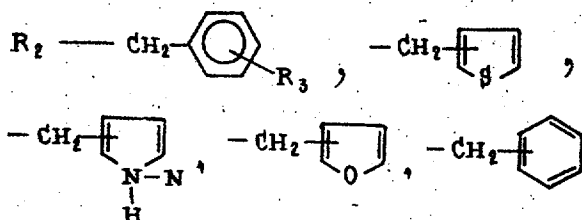
Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, к получению алкалоидов спорыньи.

Предложенные алкалоиды новые и способ их получения в патентной и научно-технической литературе не описан.

Целью изобретения является получение алкалоидов спорыньи общей формулы I



где R_1 - метил, этил, изопропил,



2

незамещенная линейная C_3 - C_5 -алкильная группа, галогензамещенная линейная C_3 - C_5 -алкильная группа, галогензамещенная бутильная группа, R_3 - C_1 - C_4 -алкил, C_1 - C_4 -алкокси, галоген и 9,10-дигидропроизводных.

Эта цель достигается тем, что штамм *Claviceps purpurea* ATCC 15383, *Claviceps purpurea* ATCC 20103 или *Claviceps purpurea* ATCC 20019, зависящие от негидроксилированных аминокислот, выращивают на питательной среде, содержащей в качестве предшественника негидроксилированную аминокислоту с последующим выделением целевого продукта.

Кроме того, в качестве негидроксилированной аминокислоты используют лейцин, фенилаланин; фенилаланин, замещенный галогеном, алкилом, радикалом алкокси, тиенилом; β -пиразолил-, фурил-, пиридилаланин; линейные C_6 - C_7 - α -аминокислоты или галогензамещенные натуральные аминокислоты.

Новые алкалоиды спорыньи проявляют фармакологические свойства (см. данные в табл. 1). Фармакологические свойства зависят от типа радикалов R_1 и R_2 , и активность этих алкалоидов

дов может изменяться в зависимости от того, присутствует ли двойная связь в положении 9-10 или ее удаляют гидрированием.

Так, например, новые алкалоиды спорыньи общей формулы I, в которой R_1 — CH_3 , а R_2 — незамещенный бензил, обладают сосудосуживающей активностью

и поэтому их можно использовать при мигрени. Производные, в которых R_1 — изопропил, а R_2 — замещенный бензил или алифатическая цепочка, имеющая гидрированную двойную связь в положении 9-10, обладают адренолитической активностью и воздействуют на центральную нервную систему, их можно использовать для лечения гипертонии.

Т а б л и ц а 1

Соединение	Адренергическая блокада		
	Fn vitro IC ₅₀ , мкг/мл	Fn vitro E D ₅₀ , мг/кг	Мышь L D ₅₀ , мкг/кг
Эрготамин	0,07	0,2	70
5'-Дибензил-5'-п-хлорбензилэрготамин	0,03	0,1	100
Дигидроэрготамин	0,02	0,08	118
5'-Дибензил-5'-п-хлорбензилдигидроэрготамин	0,02	0,05	150
Дигидроэргокристин	0,05	0,03	174
5'-Дибензил-5'-п-хлорбензилдигидроэргокристин	0,03	0,02	190

Все три новых производных проявляют по сравнению с родственными соединениями повышенную адренолитическую активность, как при применении in vitro, так и in vivo. С другой стороны, в некоторой степени понижается острая токсичность. Предлагаемые алкалоиды спорыньи представляют собой амиды лизергиновой кислоты, содержащие циклонпептидный фрагмент, получаемый биосинтетически в результате конденсации 3-аминокислот, одна из которых, т. е. пролин, присутствует во всех веществах. Циклольный фрагмент состоит, соответственно, в случае эрготамина ($R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_2C_6H_5$) из одной молекулы фенилаланина и одной молекулы α -гидроксиаланина; в случае эргокристина ($R_1 = CH(CH_3)_2$, $R_2 = CH_2C_6H_5$) из одной молекулы фенилаланина и одной молекулы α -гидроксивалина; в случае эргокриптина ($R_1 = CH(CH_3)_2$, $R_2 = CH_2CH(CH_3)_2$) — из молекулы лейцина и одной молекулы α -гидроксивалина.

Штаммы *S. purpurea*, предварительно обработанные мутагенным агентом и потерявшие способность к росту в отсутствии негидроксилированных аминокислот (т. е. фенилаланин или лейцин), приобретают способность образовывать алкалоиды, которые содержат в качестве конечной аминокислоты аналог, присутствующий в среде, при росте в присутствии аминокислоты, к действию ко-

торой они были мутагенно зависимыми, или ее аналогов.

Становится возможным получить значительно более высокие выходы алкалоида, содержащего аналог аминокислоты, в результате добавления небольших количеств аминокислоты, требуемой штамму, на первой стадии ферментации, называемой трофофазой, и последующего добавления значительных количеств аналога на второй стадии ферментации, называемой идиофазой.

Алкалоиды спорыньи получают следующим образом.

Мицелиальную пленку скоса со штаммов продуцентов эрготамина или эргокристина или эргокриптина суспендируют в стерильной воде и раздразбливают путем встряхивания в смесителе, после чего фильтруют через шелковую ткань. Фильтрат, содержащий в основном одноклеточные фрагменты, облучают УФ-светом, чтобы добиться 90-99% смертности. Суспензию разбавляют стерильной водой и помещают в чашку Петри на твердую среду, в которую дополнительно добавляют аминокислоту, для которой отыскивают требуемые мутанты (т. е. лейцин или фенилаланин). После инкубирования в течение необходимого времени разросшиеся колонии переносят по хорошо известной методике в среду, не содержащую аминокислоты, для которой отыскивают требуемые мутанты.

Штаммы, способные расти в первой среде и не способные расти во второй среде, являются зависимыми от аминокислоты. Их сохраняют последовательными переносами в среду, содержащую аминокислоту.

Для получения алкалоидов требуемые мутанты выращивают в жидкой среде, содержащей источник углерода, источник азота, источник фосфора, источник серы и несколько минеральных солей, а также аминокислоту, которая требуется штамму. Количество аминокислоты может изменяться в пределах 0,5–2 г/л. После инкубирования в течение 3–5 дней в культуры добавляют аминокислоту, требуемую штамму, в количестве 3–6 г/л и затем инкубируют еще в течение 9–11 дней так, чтобы общее время инкубации было 14 дней. Культивирование (ферментацию) можно проводить во встряхиваемых колбах либо в ферментаторах различных размеров.

К концу ферментации бульоны культур содержат аналог алкалоида и небольшие количества обычного алкалоида. Аналог алкалоида экстрагируют следующим образом.

Бульон фильтруют и мицелий несколько раз экстрагируют 4%-ным водным раствором винной кислоты. После фильтрации водную фазу подщелачивают до pH 9 гидроокисью натрия и экстрагируют хлористым метиленом.

Органическую фазу концентрируют, осаждают и перекристаллизовывают в виде соли фосфорной кислоты. Из фосфора получают свободное основание и его дополнительно обогащают природными алкалоидами путем хроматографирования на колонке с силикагелем.

Затем проводят отделение новых продуктов от природных продуктов путем фракционной кристаллизации.

Концентрацию алкалоида определяют спектрофотометрически после подкрасивания реагентом Ван Урка, причем расчет ведут при 550 нм.

Соотношение между природными и замещенными аминокислотами, присутствующими в пептидном фрагменте, определяют с помощью кислотного гидролиза алкалоида и количественным определением моноаминокислот.

Для идентификации конечных продуктов применяют обычные методы физико-химического анализа (ЯМР, ИК- и УФ-спектроскопия, масс-спектрометрия и т. п.).

Фенилаланинпотребляющие мутанты штаммов-продуцентов эргокристина или эрготамина могут производить алкалоиды, которые внедряются в фенилаланиновый фрагмент молекулы фенилаланина, замещенной в бензольном кольце галогеном, алкилами или алкоксилами. Они также могут производить алкалоиды, внедряясь в фенилаланиновый фрагмент

его изозфиров, таких как тиенилаланин, α - и β -пиразолилаланин, фурилаланин, пиридилаланин.

Лейцинпотребляющие мутанты штаммов-продуцентов эргокристина могут вырабатывать алкалоиды, которые внедряются в лейциновый фрагмент молекулы линейной α -аминокислоты, имеющей 2–7 атомов С. Они также могут производить алкалоиды, внедряясь в фрагменты лейцина природных аминокислот, замещенных атомами галогена, например таких как 5,5,5-трифторлейцин.

Пример 1. 5'-Дибензил-5'- β -хлорбензилэргокристин.

Мицелиальную пленку 12-дневного скоса на твердой среде бер 3 (см. прилагаемую табл. 2) штамма ATCC 20103 *C. purpurea* продуцента эргокристина в погруженной культуре переносят в 50 мл дистиллированной стерильной воды и фрагментируют в смесителе Варинга в течение 20 с. Суспензию фильтруют через шелковую ткань и 5 мл фильтрата выдерживают на свету (520 мкВт/см²) УФ-лампы в течение 45 с. Обработанную суспензию после разбавления помещают на твердую среду ТМ (см. табл. 2), в которую дополнительно добавляют 1% фенилаланина, в чашки Петри. Чашки инкубируют при 28°C 10–12 дней. Разросшиеся колонии переносят хорошо известным способом посева на чашки методом отпечатков на твердую среду ТМ в чашки Петри, и эти чашки инкубируют при 28°C в течение 10–12 дней.

В ходе сортировки 3000 колоний было обнаружено, что четыре штамма не способны расти на минимальном количестве среды ТМ. Эти штаммы подтверждают выделением в среде ТМ, а также в среде ТМ, в которую добавляют фенилаланин и два из них представляют собой мутанты, зависимые от фенилаланина.

Десять колб на 300 мл, каждая из которых содержит 50 мл среды ТГ (см. табл. 2), в которую добавляют 1 г/л фенилаланина, стерилизуют при 100°C в течение 30 мин и каждую из колб инокулируют мицелиальной пленкой, соответствующей приблизительно 1 см² среза твердой среды бер 3 штамма мутанта. Эти колбы инкубируют при 23°C 4 дня во вращающейся качалке, при скорости вращения 225 об/мин. Эти колбы соответствуют фазе вегетации.

Пятьдесят колб на 300 мл, каждая из которых содержит 40 мл среды Т25 (см. табл. 2), в которую добавляют 1 г/л 1-фенилаланина, стерилизуют при 105°C 25 мин, инокулируют 5 мл вегетативной культуры и инкубируют при 23°C в той же качалке, что использовали для фазы вегетации. Через 4 дня в колбы добавляют 4 г/л β -хлорфенилаланина.

Через 10 дней инкубирования культуры группируют, в результате чего получают около 2 л бульона, который содержит 700 мкг/мл пептидных алкалоидов. Их экстрагируют следующим образом.

Бульон культуры фильтруют, фильтрат отбрасывают, а мицелий суспендируют в 5%-ном водном растворе винной кислоты. После тщательного встряхивания и фильтрации осадок экстрагируют еще два раза. Объединенные фильтраты подщелачивают до pH 9 с помощью 20%-ного раствора NaOH и экстрагируют несколько раз хлористым метиленом. Органическую фазу промывают водой, концентрируют и осаждают гексаном. Полученное таким образом необработанное основание (0,9 г) обесцвечивают активированным углем, растворяют в 10 мл 95%-ного этанола и добавляют 0,8 мл 75%-ного раствора H_3PO_4 . Полученный раствор нагревают с обратным холодильником в темноте 30 мин и выдерживают при 3°C 5 дней.

В результате кристаллизуется фосфат (0,5 г), который содержит смесь эргокристина (20%) и 5'-дibenзил-5'-п-хлорбензилэргокристина (80%). Из фосфата подщелачиванием получают необработанное основание, экстрагируют CH_2Cl_2 и перекристаллизовывают из ацетона. Закристаллизованный продукт хроматографируют на колонке с силикагелем, используя в качестве элюанта смесь CH_2Cl_2 и метанола (исходное соотношение 99 : 1, конечное соотношение 90 : 10). После отбрасывания фракций содержащих декстрозовращающие изомеры, выделяют фракцию, обогащенную 5'-дibenзил-5'-п-хлорбензилэргокристином. Последовательной перекристаллизацией из бензола, метанола, ацетона выделяют искомый продукт (100 г). Кислотный гидролиз пептидного фрагмента дает аминокислоты пролин и п-хлорфенилаланин в соотношении 1 : 1. В результате щелочного гидролиза получают лизергиновую кислоту и 3,3-диметилпировиноградную кислоту.

Пример 2. Штамм мутанта, полученный в результате обработки УФ-светом, согласно примеру 1 используют для инокуляции 8 колб среды TG при тех же условиях, что описаны в примере 1. К концу фазы вегетации содержимое колб объединяют, в результате чего получают 400 мл культурального бульона и его используют для инокулирования 10-литрового ферментера, содержащего 6 л среды T25, в которую добавляют 1% фенилаланина. Ферментер снабжают мешалкой дискового типа, работающей при аэрации, соответствующей 0,5 л/мин и скорости вращения 600 об/мин. Температура инкубации 23°C. Через четыре

дня после начала ферментации в культуру добавляют 4% п-хлорфенилаланина. На 13-й день ферментации с бульона культуры снимают урожай.

Общее содержание пептидных алкалоидов соответствует 600 мкг/мл, 65% из которых представляет собой 5'-дibenзил-5'-п-хлорбензилэргокристин. Экстракцию проводят по методике, описанной в примере 1.

Пример 3. Тот же штамм, что в примере 1, ферментируют в колбах при тех же условиях, что в примере 1, как на стадии вегетации, так и на стадии продуцирования, единственное отличие заключается в том, что на 4-й день ферментации добавляют п-фторфенилаланин. На 14-й день ферментации экстракцией бульона получают 750 мкг/мл пептидных алкалоидов, причем 80% из этого количества составляет 5'-дibenзил-5'-п-фторбензилэргокристин.

Пример 4. Штамм ATCC 15383, продуцент эрготамина, обрабатывают УФ-светом в условиях, описанных в примере 1. В результате обработки получают два фенилаланинзависимых мутанта на 2000 подсчитанных колоний.

Один из этих штаммов используют в качестве прививочного материала, который добавляют в колбу ферментации при тех же условиях, что описаны в примере 1, как во время вегетативной, так и во время продуктивной фаз. На 4-й день продуктивной фазы добавляют 4% п-хлорфенилаланина. На 14-й день из бульона получают 900 мкг/мл пептидных алкалоидов, причем 80% из этого количества составляет 5'-дibenзил-5'-п-фторбензилэрготамин.

Пример 5. Штамм ATCC 20019, продуцент эргокрипина, обрабатывают УФ-светом, как описано в примере 1. В результате обработки получают три лейцинзависимых мутанта из 4000 подсчитанных колоний.

Один из этих штаммов ферментируют при условиях и в среде, описанной в примере 1, причем единственное отличие заключается в том, что на фазе вегетации и продуцирования добавляют 1 г/л и 2 г/л L-лейцина, соответственно. На 4-й день фазы продуцирования добавляют 6 г/л L-норвалина. К 14-му дню бульоны содержат 1000 мкг/мл пептидных алкалоидов, причем 80% из этого количества составляет 5-диизобутил-5'-н-пропилэргокриптин.

Пример 6. Лейцинзависимый штамм, используемый в примере 5, ферментируют в колбах при тех же условиях, как на фазе вегетации, так и на фазе продуцирования, затем добавляют 3 г/л 5,5,5-трифторлейцина, на 4-й день фазы продуцирования. На 14-й день ферментации бульоны объединяют и экстрагируют согласно общей методи-

ке, описанной ранее. Общий выход пептидных алкалоидов составляет 600 мкг/мл при 60%-ном внедрении трифторлейцина.

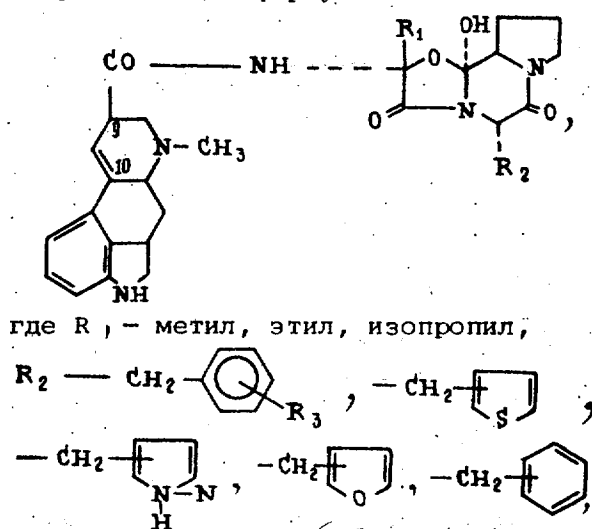
Предлагаемый способ позволяет получить новые алкалоиды спорыньи, обладающие фармакологической активностью.

Т а б л и ц а 2

Компонент	Содержание в среде			
	пер-3	ТМ	TG	T 25
Глюкоза	-	-	100	-
Сахароза	300	100	-	300
L-аспарагин $\times H_2O$	-	10	-	-
Безводная лимонная кислота	-	-	10	15
KH_2PO_4	0,5	0,5	0,5	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	0,3	0,3	0,5
Дрожжевой экстракт	-	-	0,1	0,1
KCl	-	-	-	0,12
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,007	0,007	0,007	0,007
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,006	0,006	0,006	0,006
Пептон	10	-	-	-
Агар	20	18	-	-
NH_4OH	-	-	до pH 5,2	до pH 5,2
NaOH	2	до pH 5,2	-	-
Водопроводная вода, мл	-	-	До 1000	До 1000
Дистиллированная вода, мл	До 1000	До 1000	-	-
Стерилизация	110°C x x 20 мин	110°C x x 20 мин	110°C x x 30 мин	105°C x x 25 мин

Формула изобретения

1. Способ получения алкалоидов спорыньи общей формулы



45

50

55

60

незамещенная линейная C₃-C₅-алкильная группа, галогензамещенная линейная C₃-C₅-алкильная группа, галогензамещенная бутильная группа, R₃ - C₁-C₄-алкил, C₁-C₄-алкокси, галоген, и 9,10-дигидропроизводных, отличающийся тем, что штамм *Claviceps purpurea* ATCC 15383, *Claviceps purpurea* ATCC 20103 или *Claviceps purpurea* ATCC 20019, зависимые от негидроксированных аминокислот, выращивают на питательной среде, содержащей в качестве предшественника негидроксированную аминокислоту с последующим выделением целевого продукта.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве негидроксированной аминокислоты используют лейцин, фенилаланин; фе-

нилаланин, замещенный галогеном, алкилом, радикалом алкокси, тиенилом; β -пиразолил-, фурил-, пиридилаланин;

линейные C_6-C_7 - α -аминокислоты или галогензамещенные натуральные аминокислоты.

Редактор Е. Хорина Составитель С. Малютина
Техред А.Щепанская Корректор М. Пожо

Заказ 2108/57

Тираж 673

Подписное

ЦНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4