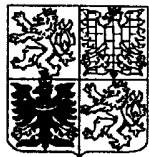


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

289 260

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1999 - 4340

(22) Přihlášeno: 03.12.1999

(40) Zveřejněno: 11.07.2001

(Věstník č. 7/2001)

(47) Uděleno: 18.10.2001

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12.12.2001

(Věstník č. 12/2001)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 D 457/00

C 07 D 457/06

C 12 P 17/12

//(C 12 P 17/12, C 12 R 1:15, C 12 R 1:38)

(73) Majitel patentu:

MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, Praha,
CZ;

(72) Původce vynálezu:

Martínková Ludmila Ing. CSc., Praha, CZ;

Křen Vladimír Doc. Ing. CSc., Praha, CZ;

Cvak Ladislav Ing., Opava, CZ;

(54) Název vynálezu:

Způsob výroby kyseliny lysergové

(57) Anotace:

Způsob výroby kyseliny lysergové, při kterém se na lysergamid a/nebo izolysergamid působí bakteriálními buňkami a/nebo jejich frakcemi obsahujícími enzym amidázu s hydrolytickou aktivitou vůči lysergamidu, jako jsou například bakteriální buňky *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp.

CZ 289260 B6

Způsob výroby kyseliny lysergové

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny lysergové.

Dosavadní stav techniky

10

Kyselina lysergová je surovinou pro přípravu terapeuticky využívaných semisyntetických námelových alkaloidů, například ergometrinu, methylelrgometrinu nebo nicergolinu. Jednou z možností její přípravy je totální chemická hydrolýza peptidických námelových alkaloidů, jako například ergocristinu nebo ergotaminu, získávaných buď extrakcí z námele nebo fermentační cestou. Při tomto způsobu výroby dochází, vzhledem k reakčním podmínkám (silně zásadické prostředí, vysoká teplota), ke vzniku vedlejších produktů a částečné degradaci kyseliny lysergové. Izolace čisté kyseliny lysergové z reakční směsi je obtížná a je spojena se ztrátami (CS pat. 222404). Naproti tomu, parciální hydrolýza uvedených alkaloidů probíhá za mírnějších podmínek a v dobrém výtěžku poskytuje směs lysergamidu a izolysergamidu, které lze však na čistou kyselinu lysergovou rozštěpit jen za drastických podmínek (pH, teplota), což vede ke ztrátám produktů a izomerizaci na kyselinu izolysergovou.

20

Podstata vynálezu

25

Předmětem vynálezu je způsob výroby kyseliny lysergové, který spočívá v tom, že se na lysergamid a/nebo izolysergamid působí bakteriálními buňkami a/nebo jejich frakcemi obsahujícími enzym amidazu s hydrolytickou aktivitou vůči lysergamidu.

30

Reakce se provádí s výhodou při teplotě 5 až 70 °C, zejména 25 až 50 °C a pH 5 až 11, výhodně 7 až 9,5. Koncentrace bakteriálních buněk nebo jejich frakcí v reakční směsi je alespoň 0,2 g sušiny/l, s výhodou 1 až 10 g sušiny/l.

35

Jako bakteriální buňky se s výhodou používají *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp. a *Pseudomonas* sp., získané například izolací z půdy běžným způsobem, které jsou schopné hydrolyzovat amidovou skupinu lysergamidu na skupinu karboxylovou.

40

V důsledku spotřeby lysergamidu z reakční směsi dochází k samovolné epimerizaci izolysergamidu za vzniku lysergamidu (mezi oběma epimery existuje za daných podmínek rovnováha). Izolysergamid je zmíněnými bakteriálními buňkami hydrolyzován podstatně nižší rychlostí, takže v produktu výrazně převládá kyselina lysergová nad nežádoucí kyselinou izolysergovou. U volných kyselin již za daných podmínek k izomerizaci nedochází.

45

Způsobem podle vynálezu se získává kyselina lysergová ve vysokém výtěžku (až 95 % hmotn.) jednoduchým a šetrným postupem.

Příklady provedení5 **Příklad 1**

Kultivace bakterie *Rhodococcus* sp. probíhala na rotační třepačce v 500 ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících 100 ml minerálního média tohoto složení (v g/l destilované vody): glukóza 10, síran amonný 3, dihydrogenfosforečnan draselný 0,5, hydrogenfosforečnan draselný 0,5, síran hořečnatý (heptahydrát) 0,5, síran železnatý (heptahydrát) 0,01, kvasničný extrakt 2 (pH upraveno na 7,5 hydroxidem draselným).

Médium bylo očkováno suspenzí buněk smytých roztokem chloridu sodného (8,5 g/l) z masopeptonového agaru (hovězí extrakt 3 g, pepton 10 g, chlorid sodný 5 g, agar 15 g, voda 1 l, pH 7,2), na kterém byla kultura bakterie uchovávána při 4 °C; počáteční koncentrace buněk byla asi 0,011 g sušiny buněk/l média). Po 24 hodinách kultivace při 30 °C byly buňky (koncentrace 0,67 g sušiny/l média) odstředěny na chlazené odstředivce, promyty 100 mM Tris/HCl pufrem (pH 8,5) a resuspendovány v tomto pufru na koncentraci 6,6 g sušiny/l. K této suspenzi byl přidán lysergamid (z 25 mM zásobního roztoku v methanolu s 0,025 mM HCl) do konečné koncentrace 1 mM.

Koncentrace substrátů a produktů v reakční směsi byla stanovena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (kolona C-18,8 µm, 250 x 4 mm; mobilní fáze 50 % methanol/50 % K-fosfátový pufr 5 mM, pH 6,9, průtok 0,9 ml/min, detekce při 310 nm).

Po 1 h inkubace reakční směsi na rotační třepačce (800 ot/min) při 30 °C dosáhl výtěžek kyseliny lysergové 37 % teorie. Po 2 h byl výtěžek kyseliny lysergové 75 % a množství kyseliny izolyselergové tvořilo pouze asi 2 %.

30 **Příklad 2**

Bakteriální buňky byly kultivovány jako v příkladu 1, promyty sodnodraselným fosfátovým pufrem (54 mM, pH 7) a resuspendovány v tomto pufru na koncentraci 6,6 g sušiny/l. Po 1 h inkubace reakční směsi na rotační třepačce (800 ot/min) při 50 °C dosáhl výtěžek kyseliny lysergové 49 % teorie.

40 **Příklad 3**

Bakteriální buňky byly kultivovány jako v příkladu 1, promyty sodnodraselným fosfátovým pufrem (54 mM, pH 7). K suspenzi buněk v tomto pufru (6,6 g sušiny buněk/l) byl přidán alkalický hydrolyzát ergotaminu - průmyslový vzorek (o složení v % hmotn. 10,3 % kyseliny lysergové, 3,5 % kyseliny izolyselergové, 44,8 % lysergamidu a 41,4 % izolyselergamidu) na konečnou koncentraci 1 mM směsi lysergamidu a izolyselergamidu.

Koncentrace substrátů a produktů v reakční směsi byla stanovena jako v příkladu 1 pomocí HPLC. Po 21 h reakce za stejných podmínek jako v příkladu 1 dosáhl výtěžek kyseliny lysergové v reakční směsi 85 %.

50

Příklad 4

5 Bakterie *Rhodococcus* sp. byla kultivována v minerálním médiu [složení média v g/l: chlorid sodný 0,1, hydrogenfosforečnan draselný 0,75, ethylendiamin - tetraoctová kyselina 0,015, síran hořečnatý heptahydrát 0,2, chlorid vápenatý dihydrát 0,031, síran zinečnatý heptahydrát 0,0067, síran manganatý monohydrát 0,0013, síran železnatý heptahydrát 0,0015, chlorid kobaltnatý hexahydrát 0,0005, síran měďnatý pentahydrát 0,0007, molybdenan sodný dihydrát 0,00045 (viz DiGeronimo MJ, Antoine AD, Appl. Environm Microbiol 31, 900, 1976)] s 8 % obj.
 10 glycerolu a 1 % obj. acetonitrilu 24 h při 30 °C. Buňky (2 g vlhké biomasy) byly odstředěny, resuspendovány v 1 ml pufru Tris/HCl (pH 7,3 s 1 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové) a dezintegrovány ultrazvukem. Po odstředění zbytků buněk byl supernatant obsahující amidázu použit jako biokatalyzátor (v množství 0,2 mg bílkoviny/ml reakční směsi) pro konverzi 1 mM lysergamidu nebo 1 mM izolysergamidu. Jako pufr byl v reakční směsi použit 54 mM
 15 sodnodraselný fosfátový pufr (54 mM, pH 7). Po 15 h reakce byla konverze obou substrátů na kyselinu lysergovou téměř 100%ní, v reakční směsi byly přítomny pouze stopy kyseliny izolysergové.

20 Průmyslová využitelnost

Způsob výroby kyseliny lysergové podle vynálezu lze využít ve farmakologickém a chemickém průmyslu.

25

PATENTOVÉ NÁROKY

30

1. Způsob výroby kyseliny lysergové, **vyznačující se tím**, že se na lysergamid a/nebo izolysergamid působí bakteriálními buňkami a/nebo jejich frakcemi obsahujícími enzym amidázu s hydrolytickou aktivitou vůči lysergamidu.

35

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se na lysergamid a/nebo izolysergamid působí bakteriálními buňkami *Rhodococcus* sp. a/nebo *Corynebacterium* sp. a/nebo *Pseudomonas* sp., a/nebo frakcemi těchto buněk.

40

3. Způsob podle nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že se reakce provádí při teplotě 5 až 70 °C a pH 5 až 11.

4. Způsob podle nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že koncentrace bakteriálních buněk v reakční směsi je alespoň 0,2 g sušiny/l.

45

Konec dokumentu
