



Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 6 b, 16/03

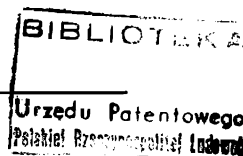
Zgłoszono: 29.VIII.1964 (P 105 597)

Pierwszeństwo: 29.VIII.1963 dla zastrz. 2
24.X.1963 dla zastrz. 3, 4
Szwajcaria

MKP C 12 d 1/02

Opublikowano: 5.I.1967

UKD



Współtwórcy wynalazku: dr Jürg Rutschmann, dr Hans Kobel, dr Emil Schreier

Właściciel patentu: Sandoz A. G., Bazylea (Szwajcaria)

**Sposób wytwarzania kwasu 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-
-karboksylowego i ewentualnie kwasu lizergowego**

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania kwasu 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowego o wzorze 1 za pomocą szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall, oraz sposobu przekształcenia tego kwasu w kwas lizergowy o wzorze 2.

Wiadomo, że różne szczepy grzyba *Claviceps paspali* Stevens et Hall zdolne są do wytwarzania w odpowiednich warunkach hodowli związków alkaloidowych, stanowiących pochodne kwasu lizergowego, od dawna znanego heterocyklicznego kwasu karboksylowego, który między innymi stanowi część składową występujących w naturze alkaloidów sporyszu. Nieoczekiwanie stwierdzono, że przez hodowlę nowego szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall można otrzymać heterocykliczny kwas karboksylowy o strukturze niespotykanej dotąd w naturze i nie otrzymanej dotąd na drodze syntetycznej ani półsyntetycznej.

Ten nowy szczep grzyba uzyskano ze sklerocji znajdujących się na trawach *Paspalum dilatatum* rosnących w okolicy Coimbra (Portugalia) i zdeponowano pod numerem NRRL 3080 w United States Department of Agriculture (Northern Utilization Research and Development Division). W przeciwieństwie do innych dotąd znanych szczepów *Claviceps paspali* Stevens et Hall nowy szczep zdolny jest wytworzyć w wyniku hodowli saprofitycznej na pożywce, składającej się z polialkoholu jak źródła węgla, soli amonowej kwasu organicznego jako źródła azotu i soli mineralnych, ja-

2

ko produkt główny kwas 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowy. Nowy szczep *Claviceps paspali* Stevens et Hall w przeciwieństwie do wszystkich innych dotąd opisanych szczepów grzyba tego rodzaju (patrz np. Proc. Roy. Soc. Serials B., 155, 33) zdolny jest do tworzenia konidiów in vitro.

Nowy szczep tworzy na podłożu agarowym glukozowoziemniaczanym w temperaturze 22°C po czternastu dniach hodowli płaskie lub nieco wypukłe kolonie o kształcie okrągłym lub owalnym o średnicy 4—8 mm i wysokości 1 mm. Brzeg kolonii jest falisty lub postrzępiony. Kolonie składają się z górnej warstwy, szarżółtej, miękkiej grzybni. Strzępki tej grzybni powietrznej mają średnicę 4,5—6 μ . Dolna warstwa grzybni przylegająca do agaru składa się z grubościennych, zawierających wakuole i gęsto upakowanych, cylindrycznych komórek o średnicy 3,5—6 μ i długości 10—16 μ . Komórki te wydzielają ciemnobrunatny barwnik do agaru.

Konidia wytworzone na pożywce agarowej z wyciągiem z kukurydzy mają wymiary $13,4 \pm 1,5 \times 4,6 \pm 0,7 \mu$.

Dla wprowadzenia metody mikrobiologicznej na skalę techniczną ogromne znaczenie ma to, czy stosowany w niej grzyb tworzy konidia czy też nie. Za pomocą konidiów można bowiem dokonać izolacji jednego zarodnika i w ten sposób uzyskać materiał genetycznie jednorodny. Działając promieniami Roentgena lub promieniami nadfioleto-

wymi, jak również związkami chemicznymi można z konidiów o wiele łatwiej wytworzyć i wyodrębnić mutanty niż z jałowej grzybni. Ponadto za pomocą konidiów można infekować kwitnące rośliny *Paspalum* wytwarzając w ten sposób na naturalnym podłożu sklerocje, nadające się bardzo dobrze do zakonserwowania szczepów.

Można na przykład z tego trwałego materiału uzyskać w każdej chwili świeży materiał do szczepienia wtedy, kiedy hodowle prowadzone *in vitro* ulegną już po wielu przeszczepach degeneracji. Konidia można także nieograniczenie długo przechowywać w postaci zliofilizowanej, co również umożliwia zakonserwowanie szczepu. Do zaszczepienia płynnej pożywki nadaje się najlepiej zawieszina konidiów, ponieważ najłatwiej można dawковать ilość materiału do szczepienia i można z nią najdogodniej pracować w warunkach jałowych (jałową grzybnię trzeba z początku zhomogenizować w mikserze).

Z kwasu 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowego, otrzymanego sposobem według wynalazku można uzyskać na drodze półsyntetycznej cały szereg nowych pochodnych o cennych właściwościach farmakologicznych. Sposobem według wynalazku można również przeprowadzić kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-karboksylowy w bardzo prosty sposób i z dobrą wydajnością w kwas lizergowy (kwas 6-metylo- $\Delta^8,10$ -ergoleno-8-karboksylowy), który ma bardzo duże znaczenie jako produkt pośredni do otrzymywania cennych leków.

Kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy można wyodrębnić z przesączu, otrzymanego w wyniku hodowli nowego szczepu zasadniczo różnymi metodami. Najlepiej wyodrębnia się go z przesączu hodowli na silnie kwaśnym wymienniaczu kationowym na przykład Dowex 50 lub Amberlit 120 zaś z wymienniacza eluuje się go za pomocą rozcieńczonego amoniaku, a następnie powoduje się jego krystalizację po uprzednim podgrzaniu eluatu w temperaturze do 30°C oraz przez nastawienie wartości pH roztworu na jego punkt izoelektryczny.

Otrzymany tym sposobem kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy można działaniem odczynników o charakterze zasadowym lub także przez proste ogrzanie przeprowadzić w kwas lizergowy. Można na przykład roztwór kwasu 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowego ogrzewać przez pewien czas w rozcieńczonym wodnym roztworze wodorotlenku sodowego o temperaturze 100°C, po czym roztwór ochłodzić i nastawić jego wartość pH na punkt izoelektryczny kwasu lizergowego. Można także wprost z przesączu z hodowli szczepu otrzymać kwas lizergowy, jeżeli na przykład po odparowaniu roztworu z suchej pozostałości wyługuje się kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy drogą ekstrakcji alkoholowym roztworem amoniaku i wytrąci kwas lizergowy w punkcie izoelektrycznym. Kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy można przez ogrzanie lub traktowanie zasadowymi odczynnikami izomeryzować do kwasu lizergowego i ten ostatni w sposób opisany wyżej wyodrębnić z roztworu. Można także, już po przepuszczeniu przesączu z hodowli przez wy-

mieniacz jonowy, amoniakalny roztwór kwasu 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowego ogrzać wprost lub po dodaniu ługu, przy czym nastąpi izomeryzacja do kwasu lizergowego.

W poniższych przykładach, objaśniono sposób według wynalazku nie ograniczając jego zakresu. Wszystkie temperatury podano w stopniach Celsjusza, temperatury topnienia są korygowane.

Przykład I. Wyodrębniania i rozmnażania nowego szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall NRRL 3080 dokonuje się w następujący sposób: z wnętrza sklerocji pobiera się w sposób jałowy mały kawałek tkanki i zaszczepia na pożywkę agarową P' o następującym składzie: 250 ml jasnej brzeczki piwnej bez chmielu (sucha masa 17%, 18 g agar-agar, woda destylowana do 1 litra (pH 5,2)). Wyrasta kolista kolnia, która po 14 dniach w temperaturze 24°C osiąga średnicę 15 mm. Tworzy ona około 1 mm powłokę na agarze o strukturze pseudosklerocjalnej, a na niej ułożona jest warstwa białej grzybni powietrznej. Brunatny barwnik dyfunduje do agaru. Nie tworzą się żadne konidia. Tę kolonię dzieli się za pomocą szpatułki na części i przenosi do probówki, w której znajduje się 12 cm³ pożywki agarowej P'' o następującym składzie:

brzeczka piwna — 500 ml
suszony wyciąg z kukurydzy — 60 g
kwas mlekowy — 1 ml
roztwór w salmiaku w ilości potrzebnej do uzyskania pH = 4,8
agar-agar — 20 g
woda destylowana do 1 litra.

Wokół każdej części szczepionki tworzy się mała kolonia o strzępkach grzybni najpierw białych, później czerwono-brązowych. Po 10 dniach zaczynają się na końcach nitkowatych rozgałęzień grzybni tworzyć zarodniki. Po 20 dniach jest wystarczająca ilość zarodników (konidiów) aby z nich sporządzić zawiesinę wodną, za pomocą której można zaszczepić 20 probówek z agarem skończym (pożywka agarowa P''). Kultury te poddaje się inkubacji w 24°C. Konidia wypuszczają kiełki po 24–36 godzinach. Po 6 dniach powierzchnia agaru powleka się równomiernie delikatnymi białymi strzępkami grzybni, po 10 dniach wytwarza się brunatnoszara, delikatnie pobryżdżona powłoka strzępków grzybni, która przylega ściśle do agaru i posiada tylko krótkie nitkowate rozgałęzienia powietrzne. Na nich wykształcają się konidia. Po 12 dniach powstają w licznych miejscach na strzępkach grzybni centra, z których wydzielają się małe kropelki czerwono-brunatnej cieczy. Kropelki osiągają średnicę 1–3 mm i stają się wskutek bardzo licznych konidiów mleczno-mętne. Po 16–18 dniach tworzenie się konidiów jest praktycznie ukończone. Kultura na agarze w probówce o średnicy 2 cm, zawierającej 12 mm pożywki agarowej posiada około 10⁹ konidiów.

W celu prowadzenia hodowli głębokiej przygotowuje się najpierw hodowlę wstępną w następujący sposób: jako podłoże hodowlane stosuje się 4,5%-owy wodny roztwór ekstraktu słodowego o pH 5,4. Jeden litr tego roztworu poddaje się sterylizacji w kolbie stożkowej o pojemności 2

litrów w ciągu 20 minut w temperaturze 110°C, po czym zaszczepia się konidiami w ilości 6×10^8 z 15-dniowej hodowli na agarze, a następnie poddaje inkubacji na wstrząsarce rotacyjnej w ciągu 3 dni w temperaturze 24°. Powstaje zwarta hodowla, składająca się z delikatnych strzępków grzybni. Strzępki tworzą luźne pęczki nitkowatych rozgałęzień grzybni i mają średnicę 2–4 mm. Nie stwierdzono obecności alkaloidów.

W celu sporządzenia większych ilości hodowli wstępnej zaszczepia się wyżej opisane podłoże w szklanych naczyniach do fermentacji zawierających po 10 litrów podłoża, konidiami w ilości 6×10^8 sztuk na każde naczynie i poddaje inkubacji w ciągu 3 dni w temperaturze 23°C przy równoczesnym napowietrzaniu (6 litrów powietrza/minutę) i mieszaniu (300 obrotów mieszadła na minutę). W celu przeciwdziałania pienieniu się używa się emulsji silikonowej. Tak otrzymane hodowle z naczyń fermentacyjnych mają tę samą konsystencję co hodowle na wstrząsarek.

W celu przeprowadzenia hodowli głównej szczególnie korzystne okazało się podłoże, zawierające w 1 litrze wody destylowanej:

sorbitu	— 50 g
kwasy bursztynowego	— 36 g
KH_2PO_4	— 2 g
NgSO_4	— 0,3 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	— 1 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	— 16 mg

Podłoże to nastawia się na pH = 5,4 za pomocą NH_4OH i zaszczepia się 10%-ami 3-dniowej hodowli wstępnej oraz poddaje inkubacji w porcjach po 100 ml w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml na wstrząsarce wahadłowej w temperaturze 23°C. Inne hodowle prowadzi się w analogiczny sposób w naczyniu fermentacyjnym z nierdzewnej stali zawierającym 170 l podłoża. Przepuszcza się przy tym 170 l powietrza na minutę i miesza się początkowo z szybkością 70, później 180 obrotów na minutę. W celu przeciwdziałania pienieniu się używa się emulsji silikonowej. W ten sposób powstają hodowle złożone z licznych strzępków grzybni. Średnica ich wynosi około 5 mm i posiadają one kuliste, zwarte jądro o średnicy około 1 mm zbudowane z tkanki pseudoparenchymatycznej.

Jądro to posiada gwiazdki złożone o długości około 2 mm wypustki z równoległe położonych nitkowatych rozgałęzień grzybni. Przy końcu 12-dniowej hodowli strzępki grzybni są zabarwione na ciemnobrunatno, a przesącz ma barwę intensywnie czerwobrunatną. Wartość pH zmienia się tylko nieznacznie. Otrzymany tym sposobem przesącz hodowli zawiera 620 mg/l mieszaniny alkaloidów oznaczoną kalorymetrycznie. Skład mieszaniny alkaloidów, zanalizowany na drodze chromatografii bibulowej jest następujący:

kwasy 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy i nieznaczne ilości kwasu lizergowego i izolizergowego	— 86,5%
amid kwasu lizergowego	— 3,9%
amid kwasu izolizergowego	— 3,9%
ergobazyna	— 1,0%
ergobazynina	— 0,5%
alkaloidy klawinowe	— 4,2%

Przykład II. Kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy.

5 l przesącza z hodowli nowego szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall NRRL 3080 o oznaczonej kolorymetrycznie zawartości pochodnych ergoliny, wynoszącej około 500 ml/l w odniesieniu do ciężaru cząsteczkowego 300 i o wartości pH = 5,6 wprowadza się do kolumny, wypełnionej 500 g Amberlitu IR 120 w postaci papki wodnej (Amberlit w postaci Ht, średnica kolumny 2,8 cm, wysokość 115 cm). Szybkość przepuszczenia roztworu przez kolumnę wynosi 500 ml(godz.). Po przemyciu kolumny 1 l wody eluuje się kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy 5-procentowym amoniakiem. Zebrany we frakcjach po 500 ml wyciek z kolumny bada się na zawartość pochodnych ergoliny metodą fluorescencji w promieniach nadfioletowych oraz reakcją barwną według Kellera (FeCl_3 — kwas octowy lodowaty, H_2SO_4 stężony).

Pierwsze cztery frakcje (w sumie 2 litry) zagęszcza się przy ciśnieniu 13 tor na łaźni w temperaturze 30° do objętości 500 ml, nastawia wartość pH = 5,5 za pomocą kwasu octowego lodowatego, odsącza od wytrąconej żywy (reakcja barwna według Kellera negatywna), przesącz podgęszcza w próżni do objętości około 25 ml, dodaje 20 ml metanolu, roztwór gotuje przez krótki okres czasu i pozostawia w spokoju przez kilka godzin w temperaturze 5°. Wykryształizowany kwas po przesączeniu przemycia się wodą i metanolem i suszy w próżni w temperaturze 80° przez 2 godziny. Z 7 frakcji amoniakalnego wycieku z kolumny, przerobionych wymienionym sposobem otrzymuje się dalsze ilości krystalicznego kwasu 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowego.

W celu oczyszczenia surowego kwasu łączy się otrzymane produkty krystaliczne, rozpuszcza w 5-procentowym alkoholowym roztworze amoniaku, otrzymany roztwór po przesączeniu nastawia za pomocą 2 n kwasu octowego na pH 5,5, ogrzewa krótko na łaźni wodnej, wykryształizowany kwas odsącza po kilku godzinach, przemycia wodą i metanolem i suszy w próżni w temperaturze 80°. Temperatura topnienia kwasu wynosi 243–245° (rozkład) $[\alpha]_D = -180^\circ$ (0,1-n. NaOH).

Reakcja barwna według Keller'a van Urk'a i Ehrlich'a taka sama jak z kwasem lizergowym, chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym przy użyciu jako fazy ruchomej mieszaniny alkoholu i 25-procentowego amoniaku w stosunku 9:1 daje wartość $R_f = 0,4-0,45$. Plama po spryskaniu odczynnikami Ehrlich'a barwi się na niebiesko.

Widmo w nadfiolecie: α 0,1 n NaOH ($\log \epsilon = \max m\mu$) = 217,5/4,56; 282/3,79; 292/3,74). Minimum przy 252 m μ . Widmo w podczerwieni: charakterystyczne pasma przy długości fali 3340, 2275 (szerokie), 1674 i 1580 cm^{-1} (w oleju wazelinowym). Kwas 6-metylo- $\Delta^8,9$ -ergoleno-8-karboksylowy przeprowadzono w chlorowodorek działaniem rozcieńczonego kwasu solnego i przez następne przekryształizowanie go z wodą i rozcieńczonego kwasu solnego, temperatura topnienia chlorowodoru 257–259° (rozkład)

$[\alpha]_D = -176^\circ$ (w 0,1 n HCL). Widmo w nadfiolecie takie samo jak kwasu 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowego. Widmo w podczerwieni: charakterystyczne pasma przy długości fali 3380, 2600, 1708, 1660 (słabe) i 1606 (słabe) cm^{-1} (w oleju wazelinowym).

Otrzymanie wolnego kwasu z chlorowodorku kwasu 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowego. Do zawiesiny 100 mg chlorowodorku w 5 ml wody dodaje się kroplami przy stałym mieszaniu 2 n roztworu kwaśnego węglanu sodu tak długo, aż zawieszona substancja całkowicie przejdzie do roztworu. Następnie roztwór nastawia się kwasem octowym lodowatym na wartość pH = 5,5, zagotowuje krótko, po kilku godzinach odsącza wykryształizowany kwas, przemywa go wodą i metanolem i suszy w próżni w temperaturze 80° . Temperatura topnienia kwasu $245-247^\circ$ (rozkład) $[\alpha]_D = -208^\circ$ (0,1 n NaOH) chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym przy użyciu mieszaniny alkoholu i 25-procentowego amoniaku w stosunku 9:1 wykazuje jedną plamę; wartość $R_f = 0,45$. Plama w promieniach nadfioletowych nie wykazuje praktycznie fluorescencji, a przy spryskaniu odczynnikami Ehrlich'a barwi się na niebiesko.

Przykład III. Kwas 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowy.

Celem uzyskania kwasu 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowego z przesączu z hodowli nowego szczepu *Claviceps paspali* postępowano tak jak w przykładzie II, z tym, że zamiast Amberlitu IR 120 używano kationitu Dowex 50. Otrzymano wtedy krystaliczny surowy kwas 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowy o właściwościach podanych w przykładzie II.

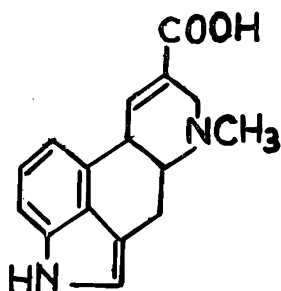
Przykład IV. Kwas lizergowy.

500 mg surowego krystalicznego kwasu 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowego, wyizolowanego

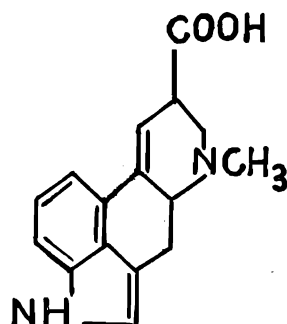
sposobem opisanym w przykładzie II z przesączu z hodowli nowego szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall NRRL 3080 ogrzewa się w 10 ml 2 n ługu sodowego w ciągu 2 godzin na łaźni wodnej, do gorącego roztworu dodaje się węgla aktywnego, sącza, a pH przesączu nastawia się za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego i kwasu octowego lodowatego na 5,5. Po kilku godzinach odsącza się krystaliczny kwas lizergowy, przemywa wodą i metanolem i suszy w próżni w temperaturze 80°C , temperatura topnienia = $245-247^\circ$ (rozkład). Otrzymany tym sposobem kwas lizergowy posiada wszystkie, dla tego związku opisane w literaturze właściwości chemiczne i fizyczne.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasu 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowego i ewentualnie kwasu lizergowego, **znamienny tym**, że hodzi się szczep *Claviceps paspali* Stevens et Hall nr NRRL 3080 saprofitycznie na pożywcę, składającej się z polialkoholu jako źródła węgla, soli amonowej kwasu organicznego jako źródła azotu i soli mineralnych, po czym z środowiska kultury wydziela się kwas 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowy korzystnie przez ekstrakcję alkoholowym roztworem amoniaku i ewentualnie przeprowadza się w kwas lizergowy.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do hodowli grzybni stosuje się jej konidia.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kwas-6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowy przeprowadza się w kwas lizergowy na drodze ogrzewania.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kwas 6-metylo- $\Delta^{8,9}$ -ergoleno-8-karboksylowy przeprowadza się w kwas lizergowy w obecności zasady jako środka katalizującego przegrupowanie.



Wzór 1



Wzór 2

