



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

212760  
(11) (B2)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 1/02

(22) Přihlášeno 19 04 78

(21) [PV 2524-78]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 19 04 77  
(16096/77) Velká Británie

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 08 84

(72)

Autor vynálezu

BEACCO ENZO, BIANCHI MARIA LUISA, MINGHETTI ANACLETO, SPALL  
CELESTINO, MILÁN (Itálie)

(73)

Majitel patentu

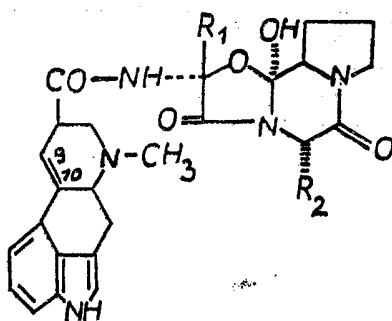
SOCIETÀ FARMACEUTICI ITALIA S.p.A., MILÁN (Itálie)

## (54) Způsob přípravy námelových alkaloidů

1

2

Vynález se týká způsobu přípravy analogů  
námelových alkaloidů obecného vzorce:



které se přirozeně nevyskytují, kvasným po-  
stupem za použití určitých mutantních kme-  
nů *Claviceps purpurea*.

Nové námelové alkaloidy vykazují různé  
farmakologické aktivity jako vazokonstrikč-  
ní aktivitu, adrenolytickou aktivitu a aktivi-  
tu na centrální nervový systém.

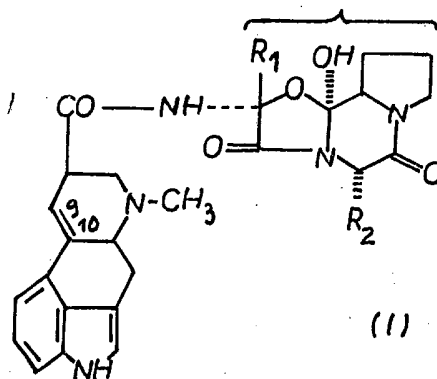
Vynález se týká způsobu přípravy námelových alkaloidů, přirozeně se nevyskytujících, kvasným postupem s určitými mutantními kmeny *Claviceps purpurea* za přítomnosti vhodných aminokyselin jako prekurzorů. Je dobře známo, že námelové alkaloidy jsou amidy kyseliny lysergové, které obsahují cykloleptidový podíl, biochemicky odvozený z vhodné kondenzace tří aminokyselin, z nichž jedna tj. prolin je přítomna vždy. Cykloleptidový zbytek zahrnuje v případě ergotaminu, kde  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , jednu molekulu fenylalaninu a jednu alfa-hydroxyalaninu; v případě ergokristinu, kde  $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ;  $R_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , zahrnuje jednu molekulu fenylalaninu a jednu alfa-hydroxyvalinu; v případě ergokryptinu, kde  $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ;  $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}(\text{CH}_3)_2$ , zahrnuje jednu molekulu leucinu a jednu molekulu alfa-hydroxyvalinu.

Překvapivě bylo zjištěno, že kmeny *C. purpurea*, které byly dříve podrobeny působení mutagenního činidla, takže nebyly schopné růst v nepřítomnosti nehydroxylovaných aminokyselin, tj. fenylalaninu nebo leucinu, jsou schopné tvořit alkaloidy obsahující jako terminální aminokyselinu analogickou sloučeninu přítomnou v médiu, pokud rostou v přítomnosti aminokyseliny, na ní byly mutagenně závislost vytvořena a jejich analogických sloučenin. Značně vyšší výtěžky alkaloidů obsahujícího analog aminokyseliny je možné získat tak, že v prvním stupni kvašení, známém jako „trofofáze“, se přidá malé množství vyžadované aminokyseliny a ve druhém stupni kvašení, známém jako „idiofáze“ následuje přidání velkého množství analogické sloučeniny.

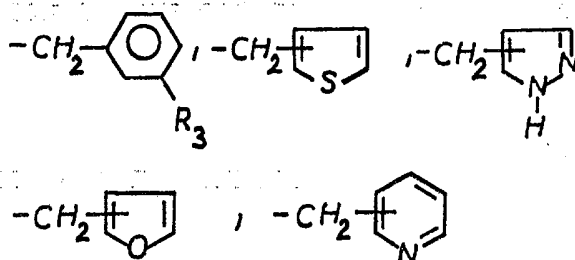
Použité kmeny jsou známými producenty námelových alkaloidů v submerzní kultuře jak byly popsány řadou autorů jako Spalla C. v *Genetic of Ind. Microorganismus*, Academia, Praha 1973, 393; Floss H. G. et al., *Phytochemistry*, vol. 8, 141, 1974). Kmeny jež mohou zejména být použity jsou: *C. purpurea* ATCC 15383, producent ergotaminu, popsán v americkém patentovém spisu č. 3 276 972; *C. purpurea* ATCC 20103, producent ergokristinu, popsán v americkém patentovém spisu č. 3 567 583 a *C. purpurea* ATCC 20019, producent ergokryptinu, popsán v americkém patentovém spisu číslo 3 485 722.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že vytváří způsob přípravy námelových alkaloidů vzorce

„cykloleptidový podíl“



a jejich 9,10 dihydroderivátů kde  $R_1$  je vybráno ze skupiny zahrnující metyl, etyl a izopropyl;  $R_2$  je vybráno ze skupiny zahrnující



halogenem substituovanou lineární  $\text{C}_3$ – $\text{C}_5$  alkyl-skupinu a halogenem substituovanou izobutyl-skupinu,  $R_3$  je vybráno ze skupiny zahrnující  $\text{C}_1$ – $\text{C}_4$  alkyl a halogen, kvasným postupem.

Podle dalšího vytvoření vynálezu se kmeny *Claviceps purpurea* ATCC 15383, ATCC 20103 nebo ATCC 20019, které byly předem působením mutagenní látkou zmutovány tak, že nebyly schopny růstu v nepřítomnosti nehydroxylovaných aminokyselin, pěstují za aerobních podmínek, při teplotě  $23^\circ\text{C}$ , v kapalném médiu o pH 5,2 asi po dva týdny v přítomnosti sacharózy jako zdroje uhlíku, citronanu amonného jako zdroje dusíku a síranu hořečnatého a primárního fosforečnanu draselného jako zdrojů síry a fosforu a v přítomnosti nehydroxylované aminokyseliny, přičemž vzniknou žádané sloučeniny vzorce I, jež se extrahují, izolují a případně purifikují chromatografií na silikagelové koloně.

Podle dalšího výhodného vytvoření vyná-

lezu jsou použitými nehydroxylovanými aminokyselinami leucin, halogenem substituovaný fenylalanin, fenylalanin nebo jeho izostery, thienylalanin, alfa a beta pyrazolylalanin, furylalanin, pyridylalanin, lineární Cz—C7 alfa aminokyselina nebo přírodní halogenem substituovaná aminokyselina.

Nové námelové alkaloidy vzorce (I) vykazují zajímavé farmakologické aktivity, udané v tabulce I, jež jsou závislé na radikálech R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> a kromě toho se tyto aktivity mohou lišit, je-li dvojná vazba v poloze 9 až 10 přítomna, nebo je-li odstraněna hydrogenací.

Například nové deriváty (I), kde R<sub>1</sub> je CH<sub>3</sub> a R<sub>2</sub> je substituovaný benzyl vykazující vasokonstriční aktivitu a proto mohou být využity při léčbě migrény. Na druhé straně nové deriváty (I), kde R<sub>1</sub> je izopropyl a R<sub>2</sub> je buďto substituovaný benzyl a nebo alifatický řetězec a kde dvojná vazba 9 až 10 je také hydrogenována, vykazují adrenolytickou aktivitu a aktivitu na centrální nervový systém, a proto mohou být použity při léčbě vysokého krevního tlaku.

T a b u l k a I  
α-adrenergická blokáda

| Sloučenina                                          | In vitro (a)<br>IC <sub>50</sub> mcg/ml | In vivo (b)<br>ED <sub>50</sub> mg/kg i. v. | LD <sub>50</sub> (myš)<br>(c) mg/kg i. v. |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| ergotamin                                           | 0,07                                    | 0,2                                         | 70                                        |
| 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzyl<br>ergotamin          | 0,03                                    | 0,1                                         | 100                                       |
| dihydroergotamin                                    | 0,02                                    | 0,08                                        | 118                                       |
| 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzyl<br>dihydroergotamin   | 0,02                                    | 0,05                                        | 150                                       |
| dihydroergokristin                                  | 0,05                                    | 0,03                                        | 174                                       |
| 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzyl<br>dihydroergokristin | 0,03                                    | 0,02                                        | 190                                       |

a) Blokáda α-receptorů byla stanovena proti spasmogennímu účinku adrenalinu na izolovaném morčecím semenném vaku metodou podle J. Brüggera, [Helv. Physiol. Acta 3, 117, 1945]. Koncentrace vyvolávající 50% inhibici účinku působící látky byly pro každou protichůdně působící látku stanoveny graficky.

b) Blokáda α-receptoru u krys byla stanovena způsobem podle Luduena F. P. et al. [Arch. Int. Pharmacodyn CXXII, 111, 1959]. ED<sub>50</sub> je graficky určená dávka protichůdně působící látky, jež ochrání 50 % zvířat před letálním účinkem 0,2 mg/kg adrenalinu, podaného intravenózně o 5 min později.

c) LD<sub>50</sub> u myši byla stanovena obvyklým postupem. Z tabulky I je vidět, že tři nové deriváty vykazují ve srovnání s příbuznými sloučeninami zvýšenou α-adrenolytickou aktivitu jak „in vitro“ tak „in vivo“. Na druhé straně je poněkud snížena prudká toxicita.

Vrstva mycelu ze šikmého agaru kmenů vytvářejících buďto ergotamin nebo ergokristin nebo ergokryptin se suspenduje ve sterilní vodě a roztlačí se na malé kousky třepáním ve Waringově mísiči a přefiltruje se přes hedvábný organtýn. Filtrát obsahující hlavně jednobuněčné fragmenty se ozáruje ultrafialovým světlem tak, aby bylo dosaženo 90 až 99 % úmrtnosti. Suspenze se naředí sterilizovanou vodou a vyseje se na Petriho misky, na pevné médium s přidanou aminokyselinou, již vyžadují hledané mutanty, tj. leucin nebo fenylalanin. Po vhodné době inkubace se narostlé kolonie přene-

sou pomocí známé techniky do prostředí, jež neobsahuje aminokyselinu, kterou vyžadují hledané mutanty. Kmeny schopné růstu v předchozím prostředí a neschopné růstu v tomto prostředí jsou závislé na této aminokyselině. Jsou udržovány následnými přenosy v prostředí obsahujícím aminokyselinu.

Pro vytváření analogů alkaloidů se mutanty pěstují v tekutém prostředí obsahujícím zdroj uhlíku, zdroj dusíku, zdroj fosforu, zdroj síry a některé minerální soli a kmenem vyžadovanou aminokyselinu. Množství aminokyseliny se pohybuje v jednotlivých případech od 0,5 do 2 g/l. Po inkubační době pohybující se od 3 do 5 dnů, se ke kultuře přidá analog vyžadované aminokyseliny v množství pohybujícím se od 3 do 6 g/l a kultura se dále inkubuje po 9 až 11 dnů k dosažení hranice 14 dnů. Kultivace tzv. kvašení může být prováděna buďto v třepaných baňkách nebo ve fermentačních tancích různých velikostí.

V závěru kvašení živná půda kultur obsahuje analog alkaloidu a také malé množství normálního alkaloidu. Analog alkaloidu se extrahuje takto:

Živná půda se přefiltruje a mycelium se několikrát extrahuje 4% vodným roztokem kyseliny vinné. Po filtraci se vodná fáze alkalizuje na pH 9 hydroxidem sodným a extrahuje se dichlormetanem.

Organická fáze se koncentruje, precipituje a krystalizuje jako sůl kyseliny fosforečné. Volná báze se získává z fosfátu a dále

obohacuje analogy přírodních alkaloidů chromatografií na koloně se silikagelem.

Oddělení nových produktů od přírodních se dosahuje frakční krystalizací.

Koncentrace alkaloidu se určuje spektrofotometricky po obarvení Van Urkovým činidlem a odečítá se při 550 mμ.

Poměry mezi přirozenými a substituovanými aminokyselinami přítomnými v peptidovém podílu se zjišťují kyselou hydrolýzou alkaloidu a kvantitativním určením jednotlivých aminokyselin.

K identifikaci konečných produktů se využívají obvyklé metody instrumentální analýzy (NMR, IR, MS, UV atd.).

Fenylalanin vyžadující mutanty kmenů-producentů ergokristinu nebo ergotaminu mohou vytvářet analoga alkaloidů tím, že inkorporují na místo fenylalaninu fenylalaninové molekuly substituované v benzenovém jádru halogeny, alkyly, alkoxyly. Rovněž mohou vytvářet alkaloidy, jež mají na místě fenylalaninu inkorporovány jeho izostery jako thionylalanin, alfa- a beta-pyrazolylalanin, furylalanin, pyridylalanin.

Leucin vyžadující mutanty kmenů-producentů ergokryptinu mohou vytvářet analoga alkaloidů, jež mají na místě leucinu inkorporovány molekuly lineárních alfaaminokyselin s 2 až 7 atomy uhlíku. Rovněž mohou vytvářet alkaloidy, jež na místě leucinu mají inkorporovány přirozené aminokyseliny substituované halogenovými atomy jako 5,5,5-trifluoroleucin.

#### Příklad 1

##### 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzylergokristin

Vrstva mycelu z 12 denního šikmého agaru s pevným médiem „pep 3“, viz příložená tabulka II, kmene ATCC 20103 C. purpurea, producenta ergokristinu v submerzní kultuře, byla přenesena na do 50 ml destilované sterilní vody a rozlámána ve Waringově míšiči po dobu 20 sekund. Suspenze byla přefiltrována přes hedvábný organtýn, 5 ml filtrátu byla vystaveno světlu (520 uWatt/cm<sup>2</sup>) ultrafialové lampy po dobu 45 sekund. Zpracovaná suspenze po vhodném ředění byla vyseta na Petriho misku s pevným médiem TM, (viz tabulka II), s přidavkem 1% fenylalaninu. Misky byly inkubovány při 28 °C po 10 až 12 dní. Narostlé kolonie byly přeneseny známou metodou, tzv. otiskovou technikou na pevné médium TM v Petriho miskách a misky byly inkubovány při 28 °C 10 až 12 dní.

Z 3000 přešetřených kolonií byly vybrány 4 kmeny neschopné růstu na minimálním médiu TM. Tyto kmeny byly potvrzeny izolací v médiu TM stejně jako v médiu TM s přidavkem fenylalaninu a 2 z nich byly prokázány jako striktně na fenylalaninu závislé mutanty.

Deset 300 ml baněk, každá s 50 ml obsa-

hem média TG, viz tabulka II, s přidavkem 1 g/l fenylalaninu, sterilizovaných 30 minut při 100 °C bylo jednotlivě inokulováno částí vrstvy mycelu mutantního kmene odpovídající přibližně 1 cm<sup>2</sup> šikmého agaru s pevným médiem „pep 3“. Tyto baňky se inkubovaly při 23 °C čtyři dny na rotační třepačce při 225 otáčkách za minutu a s průměrem opsaného kruhu 5 cm. Tyto baňky odpovídaly vegetativní fázi.

Padesát 300 ml baněk, každá s 40 ml obsahem média T 25, viz tabulka II, s přidavkem 1 g/l 1-fenylalaninu, sterilizovaných 25 minut při 105 °C bylo inokulováno, každá 5 mililitrů vegetativní kultury bylo inkubováno při 23 °C na téže třepačce jaká byla použita pro vegetativní fázi. Po 4 dnech byl do baněk přidán p-chlorofenylalanin v koncentraci 4 g/l.

Po 10denní inkubaci byly kultury smíchány, čímž se získaly asi 2 litry živné půdy, ze které se vytěžilo 700 mcg/ml veškerých peptidových alkaloidů, jež byly extrahovány takto.

##### Extrakce 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzylergokristinu

Živná půda s kulturou byla přefiltrována, filtrát byl odstraněn a mycelium bylo suspendováno do 5% vodného roztoku kyseliny vinné. Po důkladném roztřepání a filtrací byl precipitát dvakrát reextrahován. Spojené filtráty byly alkalizovány 20 % NaOH na pH 9 a několikrát extrahovány dichlormetanem. Organická fáze byla promyta vodou, zakonzentrována a precipitována hexanem. Takto získaná surová báze (0,9 g) byla odbarvena aktivním uhlím, rozpuštěna v 95 % etanolu a bylo k ní přidáno 0,8 ml 75 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Roztok byl refluxován ve tmě po 30 minut a nakonec ponechán stát při 3 °C 5 dní.

Tímto způsobem krystalovalo 0,5 g fosfátu, jež obsahoval směs ergokristinu (20 %) a 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzylergokristinu (80 %). Surová báze byla z fosfátu získána alkalizací a extrakcí CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a poté byla znovu krystalována z acetonu. Krystalovaný produkt byl chromatografován na koloně se silikagelem a eluován směsí CHCl<sub>3</sub> a metanolu s počátečním poměrem 99:1 a konečným poměrem 90:10. Po odstranění frakcí obsahujících pravotočivé izomery, byla získána frakce obohacená 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzylergokristinem. Následnými krystalizacemi z benzenu, metanolu, acetonu bylo odděleno 100 mg hledaného produktu. V MS analýze vykazoval produkt charakteristické fragmenty a m/e: 376 a 378; 278 a 280; 267, 153, 70. Kyselá hydrolýza peptidového podílu vedla k výtěžku aminokyselin prolinu a p-chlorofenylalaninu v poměru 1:1. Výtěžkem alkalické hydrolýzy byla kyselina lysergová a kyselina 3,3-dimetylpyrohroznová.

T. t. 150 až 155 °C (rozklad)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -175° (chloroform)

## Příklad 2

Mutantní kmen získaný působením ultrafialového světla jako v příkladě 1, byl použit k inokulaci osmi baňek s médiem TG za stejných podmínek jako v příkladě 1. Na konci vegetativní fáze byl obsah baňek spojen a takto získaných 400 ml živné půdy s kulturou bylo použito k inokulaci deseti-litrového fermentačního tanku, jenž obsahoval 6 litrů média T 25 s přídavkem 1% fenylalaninu. Fermentační tank byl opatřen rotačním míchadlem diskoturbínového typu se vzdušněním odpovídajícím 0,5 litrům/litr na minutu a s frekvencí 600 otáček/min. Inkubační teplota byla 23 °C. Za čtyři dny po počátku kvašení byla ke kultuře přidána 4% p-chlorofenylalaninu. Živná půda s kulturou byla sklizena 13. den kvašení.

Celkový obsah peptidových alkaloidů činil 600 mcg/ml, z čehož 65 % byl 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzylergokristin. Postup extrakce byl týž jako v příkladu 1.

## Příklad 3

Týž kmen jako v příkladu 1 byl pěstován v baňkách za stejných podmínek jako v příkladu 1 během vegetativní a produkční fáze pouze s tím rozdílem, že čtvrtý den fermentace byl přidán p-fluorofenylalanin. Čtrnáctý den kvašení bylo z extrahované živné půdy získáno celkem 750 mcg/ml peptidových alkaloidů, z čehož 80 % činil 5'-debenzyl-5'-p-fluorobenzylergokristin.

T. t. 160 až 165 °C (rozklad)

$[\alpha]_D^{20} = -171^\circ$  (chloroform)

## Příklad 4

Kmen ATCC 15383, producent ergotaminu byl ozařován ultrafialovým světlem za stejných podmínek jako v příkladu 1. Následkem tohoto působení vznikly dvě na fenylalaninu závislé mutanty z celkového množství 2000 přešetřených kolonií.

Jeden z těchto kmenů byl použit jako inokulum k pěstování v baňkách za stejných podmínek jako v příkladu 1 po dobu vegetativní a produkční fáze. 4. den produkční fáze byla přidána 4 % p-chlorofenylalaninu. Celkový výtěžek peptidových alkaloidů z živné půdy 14. dne činil 900 mcg/ml, z čehož 80 % byl 5'-debenzyl-5'-p-fluorobenzyl-ergotamin.

T. t. 180 až 186 °C (rozklad)

$[\alpha]_D^{20} = -150^\circ$  (chloroform)

## Příklad 5

Kmen ATCC 20019, producent ergokrypti-

nu, byl ozařován ultrafialovým světlem jako v příkladu 1. Následkem tohoto působení vznikly tři na leucinu závislé mutanty z celkového množství 4000 přešetřených kolonií.

Jeden z těchto kmenů byl pěstován za stejných podmínek a ve stejném médiu jako v příkladu 1, pouze s tím rozdílem, že ve vegetativní fázi bylo přidáno 1 g/l L-leucinu a v produkční fázi 2 g/l L-leucinu. 4. den produkční fáze bylo přidáno 6 g L-norvalinu. 14. dne živné půdy obsahovaly celkem 1000 mcg/ml peptidových alkaloidů, z nichž 80 % byl 5'-deizobutyl-5'-n-propylergokryptin.

T. t. 190 až 195 °C

$[\alpha]_D^{20} = -183^\circ$  (chloroform)

## Příklad 6

Na leucinu závislý kmen použitý v příkladu 5 byl pěstován v baňkách za stejných podmínek během vegetativní a produkční fáze. 4. dne produkční fáze bylo přidáno 3 g na litr 5,5,5-trifluoroleucinu. 14. den kvašení byly živné půdy spojeny a extrahovány obecným dříve popsaným způsobem. Výtěžek činil celkem 600 mcg/ml peptidových alkaloidů s 60 % inkorporací trifluoroleucinu.

## Příklad 7

Kmen ATCC 15383, producent ergotaminu byl pěstován v submerzní kultuře v médiu TG, viz tabulka 1 po 4 dny. Kultura byla zfiltrována na Büchnerově nálevce za sterilních podmínek, promyta vodou, suspendována v malém množství vody a homogenizována v Potterově homogenizátoru. Homogenát byl suspendován ve vodě a ozářen UV světlem 520 uwatt/cm<sup>2</sup> po 60 sekund.

Zpracovaná suspenze byla vyseta na pevném médiu TM s 1% fenylalaninem, 1% L-leucinem, 1% d-l alaninem. Misky byly inkubovány při 28 °C po 12 dnů. Vyroslé kolonie byly přeneseny otiskovou metodou na pevné médium na Petriho misky a byly inkubovány při 28 °C po 12 dnů.

Z prověřených 5000 kolonií byly dvě fenylalanin dependentní mutanty.

Jeden z těchto kmenů byl použit jako inokulum pro kvašení v baňce za podmínek popsaných v příkladu 1 při vegetativní a produkční fázi. 4. dne produkční fáze byl přidán 4% p-chlorofenylalanin. Půdy 14. dne obsahovaly 1100 mcg/ml všech peptidových alkaloidů, z toho 55 % 5'-debenzyl-5'-p-chlorobenzylergotaminu.

T. t. 185 až 190 °C

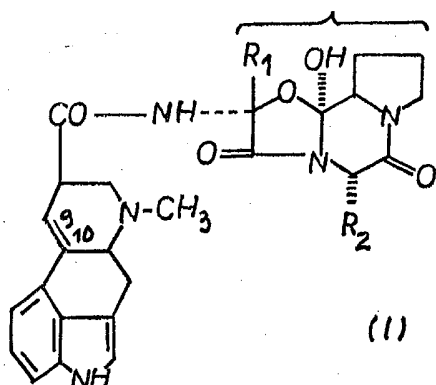
$[\alpha]_D^{20} = -155^\circ$  (chloroform)

Tabulka II

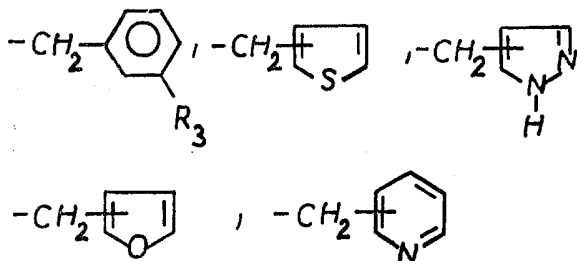
|                                       | pep 3         | TM            | Média<br>TG   | T 25          |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| glukóza                               | —             | —             | 100           | —             |
| sacharóza                             | g 300         | 100           | —             | 300           |
| L-asparagin . H <sub>2</sub> O        | —             | 10            | —             | —             |
| bezvodá kyselina<br>citronová         | —             | —             | 10            | 15            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0,5           | 0,5           | 0,5           | 0,5           |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0,5           | 0,3           | 0,3           | 0,5           |
| kvasničný extrakt                     | —             | —             | 0,1           | 0,1           |
| KCl                                   | —             | —             | —             | 0,12          |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0,007         | 0,007         | 0,007         | 0,007         |
| ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0,006         | 0,006         | 0,006         | 0,006         |
| pepton                                | 10            | —             | —             | —             |
| agar                                  | 20            | 18            | —             | —             |
| NH <sub>4</sub> OH                    | —             | —             | do pH 5,2     | do pH 5,2     |
| NaOH                                  | —             | do pH 5,2     | —             | —             |
| vodovodní voda                        | —             | —             | do 1000 ml    | do 1000 ml    |
| destilovaná voda                      | do 1000 ml    | do 1000 ml    | —             | —             |
| sterilizace                           | 110 °C/20 min | 100 °C/20 min | 110 °C/30 min | 105 °C/25 min |

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy námelových alkaloidů  
vzorce



a jejich 9,10-dihydroderivátů, kde R<sub>1</sub> je vybráno ze skupiny zahrnující metyl, etyl a izopropyl; R<sub>2</sub> je vybráno ze skupiny zahrnující



halogenem substituovanou lineární C<sub>3</sub>—C<sub>5</sub> alkyl-skupinu a halogenem substituovanou izobutyl-skupinu, R<sub>3</sub> je vybráno ze skupiny zahrnující C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub> alkyl a halogen, kvasným postupem, vyznačený tím, že kmeny *Claviceps purpurea* ATCC 15383, ATCC 20103 nebo ATCC 20019, které byly předem působením mutagení látkou zmutovány tak, že nebyly schopny růstu v nepřítomnosti nehydroxylovaných aminokyselin, se pěstují za aerobních podmínek, při teplotě 23 °C, v kapalném médiu o pH 5,2 asi po dva týdny v přítomnosti sacharózy jako zdroje uhlíku, citronanu amonného jako zdroje dusíku a síranu hořečnatého a primárního fosforečnanu draselného jako zdrojů síry a fosforu a v přítomnosti nehydroxylované aminokyseliny, přičemž vzniklé sloučeniny vzorce I, se extrahují, izolují a případně purifikují chromatografií na silikagelové koloně.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že použitými nehydroxylovanými aminokyselinami jsou leucin, halogenem substituovaný fenylalanin, fenylalanin nebo jeho izostery, thienylalanin, alfa a beta pyrazolylalanin, furylalanin, pyridylalanin, lineární C<sub>2</sub>—C<sub>7</sub> alfa aminokyselina nebo přírodní halogenem substituovaná aminokyselina.