



259457

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DERIVADOS ALCALOIDEOS DE ACIDO LISERGICO", a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACUTICI ITALIA, domiciliada en MILAN (Italia) Via F. Turati, 18.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

5. Este invento se refiere a un procedimiento para la producción de derivados alcaloides de ácido lisérgico, por fermentación sumergida con nuevas razas de Claviceps paspali Stewens y Holl, de cuyos derivados puede obtenerse de manera conocida ácido lisérgico puro.

10. Actualmente los derivados alcaloides de ácido lisérgico se obtienen predominantemente del cornezuelo de centeno, o sea de los esclerocios naturales de Claviceps purpurea (Fr) Tul. S. Stoll y colaboradores (patente norteamericana No. 2 809 920) han informado recientemente la producción de tales alcaloides por cultivo superficial saprofítico de una re-



259457

- za adéscuse de Claviceps purpurea (Fr) Tul., aislada del centeno. Otros autores (ABE y colaboradores: J. Agric. Chem. Soc. Japan 25, 1952, pág. 458; TABER y colaboradores: Canad. J. of Microbiology 4, 1958, pag. 611) han descrito procedimientos para la preparación de alcaloides por cultivo superficial saprofítico de algunas razas particulares de Claviceps. Sin embargo tales alcaloides no contienen ácido lisérgico en su molécula y son diferentes de los obtenidos por los esclerocios naturales de Claviceps purpúrea (Fr) Tul.
- 5.
10. En todas estas investigaciones, en el curso de muchos años, la producción de los alcaloides se efectúa solamente por cultivo superficial saprofítico después de 20-40 días de incubación y además la producción unitaria es tan baja que no resulta práctica.
15. Más recientemente, Spruson y colaboradores (patente australiana No. 34313/ 8) han descrito un procedimiento para la producción biosintética de alcaloides de cornezuelo de centeno por cultivo del Claviceps purpurea Tul. en condiciones esencialmente anaerobias y realizando una reducción substancial de la respiración de las células; estas condiciones presentan algunas desventajas evidentes.
20. El procedimiento del invento que aquí se expone permite la producción de alcaloides derivados de ácido lisérgico en grandes rendimientos, por medio del cultivo sumergido de nuevas razas de Claviceps en condiciones aerobias y con agitación, sin causar reducción de la respiración de las células, o sea que la formación de alcaloides de ácido lisérgico puede efectuarse por fermentación industrial.
- 25.
30. Los organismos empleados para el procedimiento de este invento son nuevas razas de Claviceps paspali Stewens y Holl. Se había descubierto que las razas Claviceps paspali



259457

Stewens y Holl, que no producen los alcaloides derivados de ácido lisérgico por cultivo sumergido, pueden virulentarse artificialmente para dar nuevas razas de Claviceps paspali, las cuales a su vez permiten la mencionada producción.

5. La virulentación artificial ocurrió de la siguiente manera. Se aisló la raza F.97 de los esclerocios crecidos sobre cepes de Paspalum disticum, recogidas en Tivoli (Roma) y se la identificó y clasificó como Claviceps paspali Stewens y Holl. Se inocularon embriones de centeno Rosen 4 n, antes de la germinación, con la raza F.97 y luego se cultivaron "in vitro". Las nuevas subespecies virulentadas se aislaron de los esclerocios obtenidos sobre dichos embriones.
- 10.

15. Las razas que se emplean en el procedimiento del invento que aquí se expone y que se describen como nuevas razas de Claviceps paspali Stewens y Holl en esta memoria y en sus reivindicaciones, se han registrado en el Instituto Superiore di Sanità, viale Regins Elena, 299, Roma (Italia) y se han designado con las marcas: F - 140; F - S15/1; F - 237; F - 240.

20. El procedimiento de este invento es por consiguiente un procedimiento para la producción de derivados alcaloides de ácido lisérgico que comprende el fermentar en condiciones aerobias un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono, nitrógeno y sal mineral con una nueva raza de Claviceps paspali Stewens y Holl tal como se ha definido precedentemente.

25. Las razas antes mencionadas tienen las siguientes características morfológicas: las colonias, obtenidas en agar-glucosa-potata en fuentes de Petri, tienen un diámetro de 1,5 - 3 cm al cabo de 10 - 15 días de cultivo a 27°C; son redondas, tienen un borde continuo y superficie lisa, muestran un micelio séreo gris blanuzco y un micelio vegetativo pardo u
- 30.

259457



oscuro. El micelio aéreo, esterciopeleado y algo fasciculado, está constituido por hifas simples o sinnemáticas, que tienen un diámetro de 3-4 micras y septa a distancia de 20-30 micras, con gotitas de grasa. El micelio vegetativo es un entramado de hifas compactas que han cambiado su estructura original en un pseudoparenquima con estructura esclerótica. En realidad, las células tienen forma poligonal, con un diámetro de 3-4 x 10-15 micras, están apretadamente unidas y muestran gran número de gotitas de material graso. La presencia de conidios o clamidospores no se ha observado nunca. Nunca se ha obtenido esporulación, ni siquiera cambiando las fuentes de carbono o nitrógeno en el medio.

Si se araña la superficie de la colonia mediante una aguja, el micelio vegetativo, que se halla debajo del micelio aéreo, presenta un color rose o de carne. Las mencionadas características constituyen un rasgo particular de estas razas, rasgo que nunca se ha observado en otras razas de Claviceps aisladas.

El cultivo sumergido el micelio forma grupos de pelletes pequeñas, redondas o irregulares, con tamaños de 0,1-1 x 0,5-3 cm, algo sueltas, que están constituidas por sinnemata formadas por hifas unidas estrechamente. Las hifas tienen un diámetro de 3-5 micras y son rectas, con muy escasas ramificaciones laterales. Las hifas contienen gran número de gotitas de grasa, incluso en los estadios primeros. El micelio, en cultivo sumergido, puede tener un color amarillo, pardo, verde grisáceo o verde, según los diferentes medios y la edad.

Respecto a la producción de derivados alcaloides de ácido lisérgico, este invento no está limitado al empleo de las razas descritas, sino que comprende también los mutantes



259457

9. de las mismas que pueden obtenerse, por ejemplo, por medio de selección o mutación por acción de rayos ultravioleta o Roentgen o cualquier otra substancia mutágena o, particularmente, por infección artificial de embriones o hierbas cultivados in vitro o cepes de hierbas cultivadas ya sea in vivo o in vitro, y los mencionados mutantes deben incluirse en la definición de una nueva raza de Cleviceps paspali Stewens y Holl.

10. De acuerdo con nuestro invento, el procedimiento se lleva a cabo de preferencia cultivando los organismos antes descritos en condiciones aerobias y en cultivo sumergido, tanto en matraces de laboratorio como en fermentadores industriales, en una solución nutritiva acuosa que contiene: sales inorgánicas, fuentes de nitrógeno y carbohidratos o sus compuestos adecuados que actúan como fuentes de carbono, hasta que se obtiene un gran rendimiento de alcaloides.

15. En lo que atañe a las sales inorgánicas, estas pueden ser cloruros y/o nitratos y/o carbonatos y/o sulfatos y/o fosfatos de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, magnesio, hierro, zinc y manganeso, pero de preferencia $MgSO_4$ y KH_2PO_4 .

20. El comportamiento de las razas descritas en este invento cuando se cultivan en presencia de Fe^{++} y Zn^{++} en el medio, es diferente del de las razas de Cleviceps purpurea descritas por Stoll y colaboradores (patente norteamericana nº 2 809 920). Estos dos elementos pueden disminuir notablemente la producción de alcaloides.

25. Las fuentes de nitrógeno pueden ser sales amónicas tales como citrato, tartrato, malato, succinato, oxalato, acetato y similares; aminoácidos y sus mezclas, péptidos o proteínas, sus hidrolizados, extractos cárnicos, fracciones acuosolubles de cereales como el maíz o el trigo; extracto de malta

30.



25-456

de trigo, licor de maceración de trigo, harinas de soja, harina de cacahuete, harina de garbanzo, harina de semilla de algodón.

5. Los carbohidratos pueden ser glucosa, sacarosa, almidón, dextrinas, sorbitol, manitol, lactosa y similares.

10. El cultivo puede realizarse en condiciones aeróbicas, en cultivo superficial o de preferencia en cultivo sumergido; puede llevarse a cabo tanto en matraces de laboratorio como en fermentadores, con agitación o en condiciones de calma y mantenimiento aerobiosis con aire u oxígeno. La fermentación se realiza a temperatura de 22° a 30°C, de preferencia a 27°C, y a un pH de 4,2 a 6, de preferencia a 5,2. La producción de los alcaloides se inicia por lo general al cabo de dos días de cultivo y el punto óptimo se alcanza al cabo de 7-9 días.

15. La evaluación del contenido de alcaloides puede efectuarse a base de ensayos de coloración por la reacción de van Urk (Pharm. Weekblad 66, 1929, pág. 473) después de extracción de la manera siguiente: el caldo de cultivo se alcaliniza a pH 9 y se extrae primeramente con cloroformo y luego se reextrae con la solución ácida acuosa (por ejemplo, H₂SO₄ al 1% o ácido tartárico al 2%) que se emplea para los análisis colorimétricos de los alcaloides.

20. Los procedimientos usuales de extracción con disolventes orgánicos adecuados, tales como benceno, cloroformo, cloruro de metileno y similares, o absorción con los conocidos medios absorbentes, tales como negro mineral, bentonita y similares, en condiciones alcalinas, pueden emplearse para la separación y aislamiento de la mezcla o los alcaloides obtenidos. La mezcla, en la cual se hallan predominantemente amida del ácido lisérgico y amida del ácido isolisérgico, puede hidrolizarse luego



259457

con álcali, de manera conocida, para formar ácido lisérgico e isolisérgico. (J. Chem. Society, 1934, pág. 674 y 1935, pág. 1440).

5. Los detalles del procedimiento del invento que aquí se expone se ilustran por medio de los ejemplos que siguen.

EJEMPLO 1.

10. Se efectúa el proceso en matraces de 500 cc que contienen 100 cc de un medio nutritivo adecuado. Los matraces se sacuden por medio de un agitador giratorio (200 revoluciones/ /minuto; carrera excéntrica: 10 cm). La temperatura óptima de incubación es de 27°C. La humedad relativa es de 85-90%. El cultivo se efectúa en la oscuridad. Se inocula un matraz con el micelio que se obtiene de un cultivo de 10 días en patata-glucosa-agar de una de las nuevas razas de Cleviceps paspali 15. Stewens y Holl antes descritas en el medio nutritivo siguiente:

	Mannitol	5%
	Acido succínico	1%
	NH ₂ PO ₄	0,1%
	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,03%
20.	Harina de garbanzo	0,1%
	Agua destilada	

el pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa de amoníaco.

25. Se forma generalmente un cultivo homogéneo en un agitador giratorio al cabo de 7-10 días de incubación y está constituido por una masa de hifas sinnemáticas. Se emplea un 10% de ese cultivo como semilla para el cultivo de prefermentación que se efectúa en matraces que contienen el mismo medio. Al 30. cabo de 4 días de cultivo se inoculan los matraces de fermentación con 10% del micelio que ha crecido en el matraz de prefermentación.



253457

El medio de fermentación para la producción de los alcaloides tiene la composición siguiente:

	Mannitol	5p
	Acido succínico	3p
5.	KH_2PO_4	0,1p
	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,03p
	Agua destilada.	

El pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa de amoníaco.

10. En este medio la producción media de alcaloides alcanza 1000 micras g/ml al cabo de 7-9 días de incubación.

Diez litros del caldo de cultivo, obtenido por medio de 110 matraces de fermentación, se filtran y se separa el micelio, ya que contiene una cantidad muy baja de alcaloides. El caldo filtrado, de color oscuro (que contiene aproximadamente 1000 micras g/ml de alcaloides) se alcaliniza agregando carbonato cálcico o solución de hidróxido sódico y se extrae con 10 litros de una mezcla de cloroformo-isobutanol (4:1). El extracto orgánico se vuelve a extraer con una solución acuosa de ácido tartárico al 2p. La solución ácidosacuosa se concentra luego en vacío y a 20-40°C hasta pequeño volumen (aproximadamente una décima parte del volumen original). La solución residual se alcaliniza, se extrae con cloroformo y se evapora el disolvente. Se obtiene un polvo blanco cristalino, del cual, por hidrólisis alcalina de manera conocida, se obtienen ácido lisérgico y ácido isolisérgico.

25.

EJEMPLO 2.

El cultivo se efectúa con el siguiente medio nutritivo:

	Mannitol	5p
	Acido maleico	3p
30.	KH_2PO_4	0,1p



259457

MgSO₄ · 7 H₂O 0,03%

Agua destilada

El pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa de amoníaco.

La fermentación se efectúa conforme al procedimiento

5. descrito en el ejemplo 1. Al cabo de 7-9 días de incubación la producción de alcaloides alcanza el valor de 1000 micras g/ml. El mismo rendimiento se obtiene si se emplean ácido tartárico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido acético, ácido fumárico o ácido succínico.

10. EJEMPLO 3.

El cultivo se efectúa con el siguiente medio nutritivo:

Sorbitol 5%

Acido maleico 3%

15. KI₂PO₄ 0,1%

MgSO₄ · 7 H₂O 0,03%

Agua destilada

El pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa de amoníaco.

20. La fermentación se efectúa de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Al cabo de 7-9 días de incubación, la producción de alcaloides alcanza 1000 micras g/ml.

EJEMPLO 4.

El cultivo se efectúa en el siguiente medio nutritivo:

25. Mannitol 4%

Glucosa 1%

Acido succínico 2%

KI₂PO₄ 0,1%

MgSO₄ · 7 H₂O 0,03%

30. Harina de garbanzo 0,5%



259457

Agua destilada

El pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa de amoníaco.

La fermentación se efectúa de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Al cabo de 7-9 días de incubación, la producción de alcaloides alcanza 1400-1600 micras g/ml.

5.

Otras fuentes apropiadas de nitrógeno son: harinas de soja, harinas de cacahuete, harinas de haba, harinas de lentejas, harinas de guisante, harinas de patata, caseína hidrolizada, extracto de levadura, solución de maíz molido y similares.

10.

EJEMPLO 5.

Se efectúa la fermentación en fermentadores de vidrio que tienen una razón h/D no inferior a 3. En cada fermentador se vierten 4 litros del siguiente medio nutritivo:

15.	Mannitol	5%
	Acido succínico	3%
	KH ₂ PO ₄	0,1%
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,03%
	Agua destilada	

20. El pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa de amoníaco.

La esterilización se efectúa en una autoclave durante 30 minutos a 100°C y durante 40 minutos a 120°C. Los fermentadores se airean desde el fondo por un rociador de vidrio sinterizado. La espuma se regula agregando los agente antiespumantes usuales, tales como aceite de vaseline (Vaseline es una marca comercial registrada) que contiene 5% de Alkaterge y similares. La temperatura de incubación se mantiene a 27°C.

25.

El inoculante está constituido por 400 cm del cultivo preparado tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Al cabo de 4-6 días de cultivo, la producción de alcaloides alcanza

30.



258457

el punto óptimo indicado en el Ejemplo 4.

EJEMPLO 6.

El medio nutritivo tiene la composición siguiente:

- | | | |
|----|-----------------------|-------|
| 5. | Sorbitol | 5% |
| | Acido succínico | 1% |
| | KH_2PO_4 | 0,1% |
| | $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0,03% |
| | Harinas de garbenzo | 1% |
| | Agua destilada | |

10. El pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa de amoníaco. La fermentación se efectúa como se ha descrito en el Ejemplo 5.

Al cabo de 4-7 días de cultivo, la producción de alcoloides llega al punto óptimo indicado en el Ejemplo 4.

15. EJEMPLO 7.

Se efectúa la fermentación en fermentadores de acero inoxidable que tienen 4 metros de altura por 0,2 metros de diámetro. En cada fermentador se vierten 90 litros del medio nutritivo siguiente:

- | | | |
|-----|-----------------------|-------|
| 20. | Mannitol | 5% |
| | Acido succínico | 1% |
| | KH_2PO_4 | 0,1% |
| | $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0,03% |
| | Harinas de garbenzo | 0,1% |
| 25. | Agua destilada | |

El pH se ajusta a 5,2 con solución acuosa.

La esterilización se efectúa en otro recipiente adecuado, de manera que el líquido de cultivo no entre en contacto con el vapor directo. En efecto, se ha observado que los mínimos vestigios de hierro en el medio causen una disminu-

30.



25-457

ción de la producción de alcaloides. El inoculante está constituido por 9 litros de un cultivo preparado tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. El aire entra por el fondo a través de un rociador poroso (1 volumen de aire/1 volumen de líquido/1 minuto).

5.

Al cabo de 8-9 días de incubación, se obtienen los mismos altos rendimientos de alcaloides señalados en el Ejemplo 4.

EJEMPLO 8.

10.

Se efectúa la fermentación en fermentadores de acero inoxidable que contienen 50 litros del medio siguiente:

Mannitol	4,0
Glucosa	1,0
Acido succínico	2,0
KH_2PO_4	0,1%
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,03%
Agua destilada	

15.

Se ajusta el pH a 5,2 con solución acuosa de amoníaco. La fermentación se efectúa con agitación y aireación.

20.

Al cabo de 6-9 días de incubación, se obtienen altos rendimientos de alcaloides, como los señalados en el Ejemplo 4.

La invención, dentro de su esencialidad, puede ser desarrollada en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, pues, realizarse con los medios y aparatos más adecuados, por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.

25.

La invención, dentro de su esencialidad, puede ser desarrollada en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, pues, realizarse con los medios y aparatos más adecuados, por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.



259457

NOTA

Descrito el invento, se declaren nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la patente italiana nº 11 127/59 del 7 de Julio de 1959:

5. 1. Procedimiento para la producción de derivados alcaloides de ácido lisérgico, que comprende el fermentar en condiciones aerobias un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono, nitrógeno y sal mineral con una nueva raza de Claviceps paspali Stewens y Holl tal como se ha definido precedentemente.
10. 2. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 1, que se efectúa por cultivo sumergido.
15. 3. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el cual la nueva raza se obtuvo de Claviceps paspali y se produjo de esclerocios cultivados sobre embriones de centeno, inoculados antes de la germinación con Claviceps paspali Stewens y Holl y luego cultivados in vitro.
20. 4. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se efectúa a temperatura de 22° a 30°.
25. 5. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el medio nutritivo tiene un pH de 4,2 a 6.
30. 6. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual las sales minerales



son KH_2PO_4 y MgSO_4 .

25 457

5. 7. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual la fuente de nitrógeno es harina de garbanzo, harina de soja, harina de cacahuete, harina de haba, harina de lenteja, harina de guisante, harina de patata, extracto de malta, caseína hidrolizada o líquido de maceración de trigo.
10. 8. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la fuente de carbono es hidrato de carbono.
15. 9. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 8, en el cual el hidrato de carbono es glucosa, sacarosa, almidón, manitol, lactosa o sorbitol.
20. 10. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual derivado alcaloide se recupera al final de la fermentación filtrando el medio, alcalinizando el filtrado y extrayendo el derivado del medio por extracción con un disolvente orgánico inmisible en agua o por absorción sobre un material absorbente de sólidos.
25. 11. Procedimiento en conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el derivado se hidroliza ulteriormente en condiciones alcalinas para dar ácido lisérgico o ácido isolisérgico.
12. Procedimiento para la producción de derivados alcaloides de ácido lisérgico.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de quince páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

= 15 =



Madrid, a 6 de Julio de 1960.

SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA.

p. a.

[Faint handwritten signature and illegible text]

259457

R/rm.