



260746

C E R T I F I C A D O
D E
A D I C I O N

por "MEJORAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 259457"
por "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DERIVADOS ALCALOIDES
DE ACIDO LISERGICO", a favor de la firma italiana SOCIETA
FARMACEUTICI ITALIA, domiciliada en MILAN (Italia) Via F. Tu-
rati nº 18.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente certificado de adición se refiere a mejoras en el objeto de la patente principal No. 259457, por "procedimiento para la producción de derivados alcaloides, de ácido lisérgico.

5. En la solicitud de la patente principal se describe y reivindica un procedimiento para la producción de derivados alcaloides del ácido lisérgico que comprende el hacer fermentar en condiciones aerobias un medio nutricio acuoso, que contiene una fuente de carbono, nitrógeno y sal mineral,
10. con una nueva raza de Claviceps Paspali Stevens et Hall.

260746



5. Llevando a cabo el procedimiento descrito en la solicitud No. 259,457, se obtiene una mezcla de alcaloides que comprende prevalentemente amida del ácido D-lisérgico y amida del ácido D-isolisérgico. Ahora hemos descubierto que si, después de separar el micelio por filtración, se efectúa la extracción del caldo de cultivo en condiciones particulares de temperatura y pH, se obtienen prevalentemente dos nuevos derivados alcaloides del ácido D-lisérgico y del ácido D-isolisérgico, que

10. tienen estructura carbinolamídica.

El procedimiento de este invento comprende el separar el micelio filtrando un caldo de cultivo producido por la fermentación en cultivo sumergido de razas virulentadas de Claviceps Paspali Stevens et Hall, cuya

15. preparación se describe en la solicitud No. 259,457, y extraer el caldo con un disolvente orgánico a un pH entre 7 y 9 y una temperatura entre 0°C y 10°C.

Con mayor detalle, el procedimiento de este invento puede describirse de la manera siguiente:

20. Se separa por filtración el micelio de caldos de cultivo que contienen aproximadamente 500-1500 γ/cm^3 de alcaloides (determinado colorimétricamente como ergometrina) que son producidos por la fermentación en cultivo sumergido de razas virulentadas de Claviceps Paspali Stevens et Hall, como se ha descrito en la solici-

25. tud No. 259.457, se enfria a una temperatura en la gama de 0°C a 10°C, de preferencia a 5°C, y se ajusta el pH entre 7 y 9, de preferencia a 8, por la adición de carbonatos o bicarbonatos alcalinometálicos, tales como el carbonato o bicarbonato sódico o potásico. La extrac-

30.



260746

ción de los alcaloides se efectua con un disolvente orgánico enfriado a temperatura entre 0° y 10°C, tal como cloroformo o n-butanol o una mezcla de estos, o éter, benceno, acetato de etilo o acetato de amilo.

5. Los alcaloides pueden entonces concentrarse y purificarse por varias transferencias sucesivas (3-4) del disolvente orgánico a una fase ácido acuosa, tal como ácido tartárico acuoso 0,1 molar, y viceversa, ajustándose antes de la extracción con el disolvente orgánico el pH de la fase acuosa entre 7 y 9 y la temperatura siempre entre 0° y 10°C.

10. El nuevo derivado alcaloide de ácido D-lisér-gico se obtiene del disolvente orgánico por cristaliza-ción, mientras el derivado isómero de ácido D-isolisér-gico se aísla del líquido madre en pequeñas cantidades.
15. Los nuevos alcaloides pueden aislarse también por la formación de sus maleatos en solución etérea, seguida por precipitación y cristalización fraccional o por un procedimiento equivalente de purificación.

20. Es una ventaja del procedimiento de este invento que el derivado del ácido D-lisérgico se obtiene predominantemente a costas del derivado de ácido D-iso-lisérgico, que como es sabido resulta menos interesante farmacológicamente que el isómero correspondiente de ácido D-lisérgico.

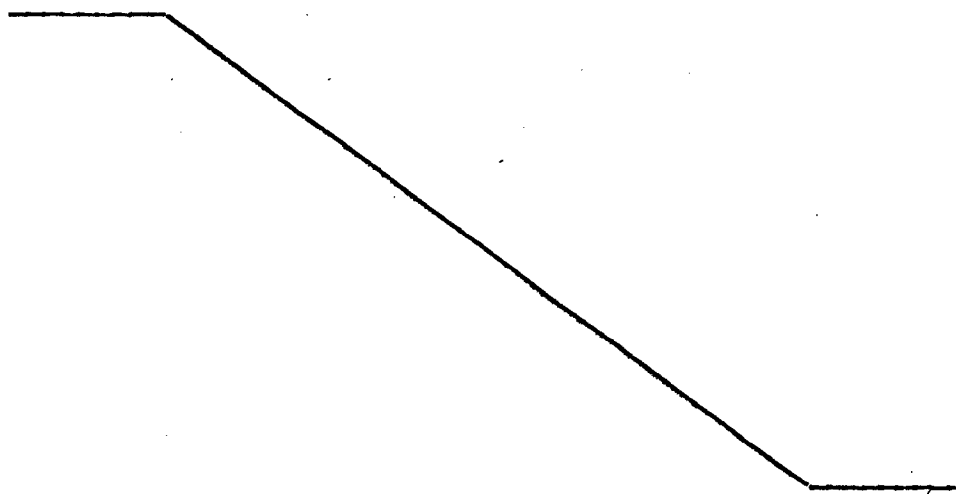
25. Los dos nuevos alcaloides del invento tienen la fórmula empírica $C_{18}H_{21}O_2N_3$ y cuando se hacen reac-cionar con ácido maléico en éter, se obtienen los maleatos correspondientes, que poseen la fórmula empírica $C_{22}H_{25}O_6N_3$.

30. La hidrólisis ácida o alcalina de los nuevos



260746

- alcaloides de este invento proporciona acetaldehído, que puede determinarse tanto cualitativa como cuantitativamente por la formación de una dinitrofenil-hidrazona. La amida de ácido D-lisérgico o la amida de ácido D-isolisérgico,
5. según sea el caso, que cabe aislar de la mezcla reaccional, puede estimarse mediante una hidrólisis alcalina según Smith y Timmis, J. Chem. Soc. 1936, 1440, que produce ácido D-lisérgico o ácido D-isolisérgico, según sea el caso.
10. Los nuevos derivados alcaloides de ácido D-isolisérgico pueden obtenerse de los derivados isómeros de ácido D-isolisérgico, y viceversa, por los conocidos procedimientos isomerizantes de la literatura (Smith y Timmis, J. Chem. Soc. 1936, 1166).
15. Los espectros ultravioleta son idénticos a los de otros derivados de ácido D-lisérgico y D-isolisérgico (λ_{max} a 242 m μ y 312 m μ).
- La tabla que sigue reseña otras propiedades físicoquímicas de los dos nuevos alcaloides de este invento.
- 20.



26-746



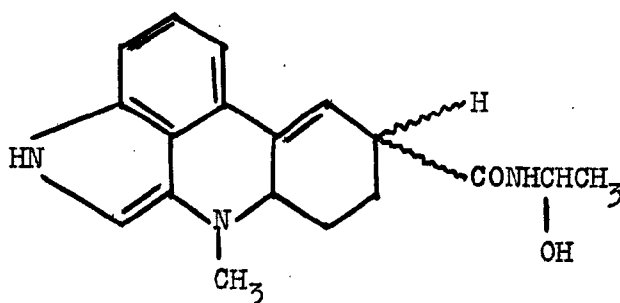
T A B L A

Propiedad	Derivado de ácido D-lisérgico	Derivado de ácido D-isolisérgico
Punto de fusión	135°C (empieza la descomposición)	70°C (empieza la descomposición)
Punto de fusión del maleato	50°C (descomposición)	-----
$[\alpha]_D^{22}$ (1% en dimetilformamida)	+29° ± 2	-----
Solubilidad	Soluble en alcoholes inferiores, dimetilformamida, piridina. Escasamente soluble en cloroformo frío, éter, benceno, agua. Insoluble en éter de petróleo.	Soluble en alcoholes inferiores, piridina, cloroformo, acetona, acetato de etilo y dimetilformamida. Escasamente soluble en éter, benceno y agua.
R _f (butanol/ácido acético/agua 4:1:5)	0,64 - 0,70	0,73 - 0,77
RE = R _f del nuevo alcaloide R _f de la ergometrina	0,97	1,10
<u>Espectro infrarrojo</u>		
Máximas evidentes (en micras)	2,94; 3,03; 5,99; 6,55; 6,88; 8,85; 12,76; 13,31;	3,05; 3,41; 6,02; 6,52; 6,89; 7,27; 7,44; 7,72; 7,91; 9,22; 12,42; 12,81; 13,32;
Máximas menos evidentes (en micras)	3,29; 3,42; 3,52; 3,60; 7,25; 7,43; 7,57; 7,72; 8,10; 8,15; 8,58; 9,23; 9,56; 10,02; 10,69; 11,46;	3,28; 3,51; 3,57; 5,81; 8,11; 8,22; 8,58; 9,48; 9,60; 10,12; 10,78; 11,56; 11,89; 14,39;
Puntos de inflexión (en micras)	6,08; 7,84; 8,31; 8,98; 13,55;	6,23; 8,77;



260746

El comportamiento químico de los dos nuevos productos de este invento nos hace opinar que la estructura química de dichos compuestos debe de ser:



5. siendo uno de los alcaloides un derivado de ácido D-lisérgico y el otro un derivado de ácido D-isolisérgico.

10. Los nuevos alcaloides, particularmente el derivado de ácido D-lisérgico, muestran buena actividad farmacológica como sustancias oxitócicas y son útiles como intermediarios en la fabricación de ácido D-lisérgico por los procedimientos conocidos de la literatura.

15. El invento se ilustra mediante los ejemplos que siguen, de los cuales el ejemplo 1 expone las condiciones para obtener las amidas de ácido D-lisérgico y ácido D-isolisérgico, mientras el ejemplo 2 da los detalles para obtener los dos nuevos alcaloides del invento.

EJEMPLO 1.

20. De 23 litros de un caldo de fermentación, obtenido como está descrito en la solicitud No. 259,457, y que contiene 800 Y/c.c. de alcaloide (determinado colorimétricamente como ergometrina), se separa por filtración el micelio y se ajusta el pH a 8 con una solución acuosa diluida de hidróxido sódico. Los alcaloides se extraen a temperatura ambiente con una mezcla de cloroformo y

26 746



- n-butanol (4:1); del extracto orgánico se extraen los alcaloides con una solución acuosa de ácido sulfúrico diluido (1:100). Se alcaliniza luego a pH 8 el extracto ácido acuoso y se extrae por dos veces con 1500 cc de cloroformo. El extracto clorofórmico se seca sobre sulfato sódico y se concentra en vacío a unos 600 cc. Por enfriamiento se obtienen 3,07 mg de amida del ácido D-lisérgico (punto de fusión, 240°C después de recristalización en acetona acuosa).
- 5.
10. Se concentra todavía más el líquido madre y se trata el residuo con éter de petróleo. Se forma un precipitado, que se filtra, se seca y se extrae con cloroformo. Se obtiene amida del ácido D-isolisérgico (punto de fusión, 120-130°, con descomposición, después de recristalización en metanol). El producto, que es insoluble en cloroformo, comprende una mezcla de amida del ácido D-lisérgico y pequeñas cantidades de los dos nuevos alcaloides del invento, que pueden aislarse como productos puros con gran dificultad por cristalización fraccional u otros métodos aplicables industrialmente.
- 15.
20. EJEMPLO 2.
- 460 cc. de un caldo de cultivo filtrado del micelio, obtenido en conformidad con el procedimiento descrito en la solicitud No. 259,457 y que contiene 450 γ /cc. de alcaloides (determinado colorimétricamente como ergometrina) se enfrían a 5°C y se ajusta el pH a 8 mediante la adición de bicarbonato sódico. Se extraen los alcaloides con cloroformo enfriado a temperatura entre 2 y 5°C (unos 500 cc.) y el extracto clorofórmico se extrae con 50 cc. de ácido tartárico
- 25.
- 30.



260746

5. acuoso 0,1 molar. Se efectuan varias transferencias (3-4) entre el disolvente orgánico y el ácido diluido y, actuando en la zona de temperatura de 0 a 10°C y ajustando entre 7 y 9 el pH de la fase acuosa antes de la extracción con disolvente orgánico, se obtiene un extracto clorofórmico final de unos 20 cc.

10. Actuando a 0°C, se obtienen 18 mg del derivado de ácido D-lisérgico a que se refiere el invento (punto de fusión, 135° con descomposición; $[\alpha]_D^{22} = +29 \pm 2$ (1% en dimetilformamida); λ_{\max} a 242 m μ y 312 m μ ; espectro infrarrojo como se ilustra en la Figura 1 de los dibujos acompañantes; fórmula empírica C₁₈H₂₁O₂N₃). Del líquido madre, por concentración en vacío, filtración del precipitado y cristalización fraccional sucesiva, se obtienen pequeñas cantidades del derivado de ácido D-isolisérgico a que se refiere el invento (punto de fusión, 70°C; λ_{\max} a 242 m μ y 312 m μ ; espectro infrarrojo como se ilustra en la Figura 2 de los dibujos acompañantes; fórmula empírica C₁₈H₂₁O₂N₃).

15. Los dos nuevos alcaloides, disueltos en metanol y hechos reaccionar con ácido maléico en éter, dan los correspondientes maleatos, que tienen la fórmula empírica C₂₂H₂₅O₆N₃.

20. Los dos nuevos alcaloides pueden obtenerse también mediante la formación de sus maleatos, con ácido maléico en solución etérea, seguido por cristalización fraccional.

25. Cada uno de los dos nuevos compuestos puede ser transformado en una mezcla en equilibrio de las dos formas isómeras, de la cual pueden aislarse ambas formas

30.



260746

por tratamiento en condiciones ácidas, por ejemplo en ácido acético acuoso al 10% a 80°C durante 1 hora, alcalinizando a baja temperatura, extrayendo con cloroformo y efectuando por último cristalización fraccionada.

5. 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.
- 10.

= . =

N O T A

15. Descrito el invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la patente italiana No. 5257 (Núm. prov.) del 19 de Julio de 1960.

20. 1. Mejoras en el objeto de la patente principal No. 259457, por "procedimiento para la producción de derivados alcaloides de ácido lisérgico", ya sea del ácido D-lisérgico o del ácido D-isolisérgico, que comprende el filtrar del micelio un caldo de cultivo producido por la fermentación en cultivo sumergido de razas virulentadas de Claviceps Paspali Stevens et Hall, cuya preparación ya se ha descrito en la patente principal y en extraer el caldo, con un disolvente orgánico a pH entre 7 y 9 y temperatura entre 0°C y 10°C.
- 25.



26 746

5. 2. Mejoras en conformidad con la reivindicación 1, en las que el extracto se concentra y purifica por transferencias sucesivas del disolvente orgánico a una fase ácido acuosa, y viceversa, a temperatura entre 0°C y 10°C, y finalmente ajustando el pH de la fase acuosa entre 7 y 9 antes de la extracción con el disolvente orgánico.
10. 3. Mejoras en conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, en las que los derivados producidos se aíslan del disolvente orgánico por cristalización fraccionada.
15. 4. Mejoras en conformidad con las reivindicaciones 2 o 3, en las que la fase ácido acuosa comprende ácido tartárico.
20. 5. Mejoras en conformidad con la reivindicación 1, caracterizadas por el hecho de que la transformación del primer alcaloide en el segundo, y viceversa, se efectúa por isomerización en condiciones ácidas, seguida de aislamiento y separación de los dos isómeros por extracción y cristalización fraccionadas.
25. 6. Mejoras en conformidad con la reivindicación 1, caracterizadas por el hecho de que los dos nuevos alcaloides mencionados se degradan de manera conocida efectuando una hidrólisis en condiciones ácidas o alcalinas.
30. 7. Mejoras en el objeto de la patente principal No. 259457, por "procedimiento para la producción de derivados alcaloides de ácido lisérgico".

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de diez páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, acompañadas de una lámina de dibujos.

Madrid, a 1 de septiembre de 1960.

SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA.

p. a.

JUAN PÉREZ VIALLES

R/pp.

260746



260746

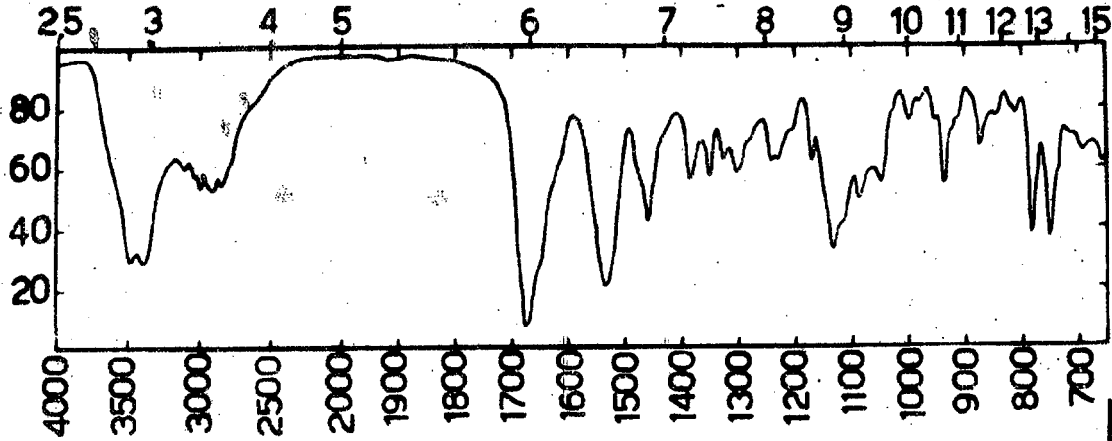


fig. 1

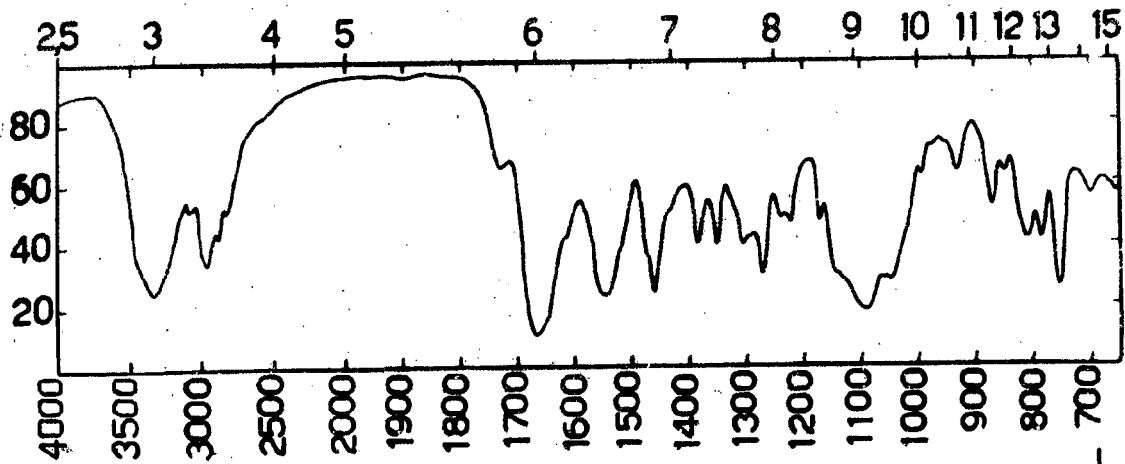


fig. 2

Madrid, 1960
Jaime Isern
p.a.