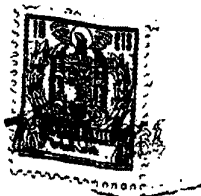


303516

PATENTE DE INVENCIÓN 2



Ref: Case 1854. 37/ST/AMK.

303516

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"Procedimiento para la obtención de ergobasina"

=====

*Solicitante:* SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea,  
Suiza.

=====

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de ergobasina mediante cultivo saprofitico de una nueva cepa de *Claviceps paspali* Stevens et Hall.

5. La ergobasina (también llamada Ergometrina o Ergo-



- novina) es uno de los alcaloides del cornezuelo natural y se puede aislar de las esclerotias de *Claviceps purpurea*. Este aislamiento es sin embargo incómodo y de poco rendimiento, ya que la ergobasina se ha de separar aquí
5. de los otros alcaloides del cornezuelo. También es posible obtener la ergobasina por vía semisintética de los derivados reaccionables del ácido lisérgico (Helv. Chim. Acta, tomo 26, pág. 956 (1943); Patentes US. 2.736.728 y 3.084.164). El ácido lisérgico necesario para este
10. procedimiento se ha de obtener, sin embargo, también primeramente por vía microbiológica o por disociación hidrolítica de otros alcaloides del cornezuelo terapéuticamente menos valiosos, ya que la síntesis total del ácido lisérgico, por razones de coste, técnicamente es
15. irrealizable.
- Debido a sus valiosas propiedades farmacológicas (efecto oxitócico y vasoreductor) se emplea la ergobasina en la medicina como medio auxiliar para partos y contra la jaqueca. Por lo tanto no han faltado ensayos
20. para obtener directamente la ergobasina por cultivo saprofito de cepas del cornezuelo. Siempre que en los filtrados de cultivo obtenidos se llegaba a demostrar ergobasina, su concentración allí era tan reducida que la producción de este alcaloide por esta vía era técnicamente imposible: el máximo rendimiento logrado hasta
25. ahora (calculado sobre el peso del cultivo total secado) era de 0,03 % (cultivando una cepa de *Claviceps microcephala*, Scientia Sinica Tomo 11, 917-924, 1962).
- Se ha descubierto ahora que mediante cultivo sub-
30. merso de una nueva cepa de *Claviceps paspali* Stevens et

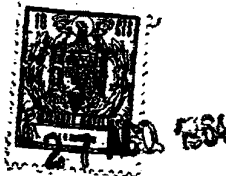
303516



Hall y elaboración del filtrado del cultivo según métodos en sí conocidos, se obtiene ergobasina en un rendimiento que hace posible la realización técnica de este proceso. De esta manera se ha encontrado por primera vez un camino para obtener el alcaloide ergobasina, médicamente tan importante, directamente y en rendimiento relativamente elevado. La cepa empleada para este procedimiento se aisló de las escleróticas que se encontraron sobre *Paspalum dilatatum* en Olivarría (Argentina). Dos muestras de este hongo se depositaron en el United States Department of Agriculture (Northern Utilization Research and Development División) Peoria, Illinois, bajo los números NRRL 3081 y 3082. Contrario a las Cepas de *Claviceps paspali* Stevens et Hall (Arcamone et al., Proc. Roy. Soc. Serials B, 155, 26, 1961; Nature, 187, 238, 1960) hasta ahora descritas, esta nueva cepa es en vitro capaz de formación de conidios.

Para la realización de procedimientos microbiológicos en escala técnica es de gran importancia si el hongo correspondiente forma conidios o no. Así con la ayuda de conidios es posible efectuar aislamientos monoespóricos y de esta manera lograr material genéticamente unitario. También de los conidios se pueden producir por radiaciones de rayos X y ultravioleta, así como con productos químicos, mucho más fácilmente mutaciones y aislarlas que del micelio estéril. Además se pueden infectar plantas de *Paspalum* en flor con los conidios y de esta manera producir sobre el portador natural escleróticas que son excelentes adecuados para la conservación de la cepa. De este material duradero se puede obtener

303516



en cualquier momento material inyectable fresco cuando los cultivos in-vitro degeneren después de repetidas pasadas. Los conidios se pueden almacenar también indefinidamente liofilizados o después de secado por congelación,

5. lo que asimismo hace posible la conservación de una cepa. Finalmente resulta también más adecuada para una inyección de un caldo de cultivo una suspensión de conidios ya que la cantidad de inyección se puede dosificar en forma más adecuada y porque con ello se puede trabajar

10. más fácilmente en forma esteril. Un micelo esteril por el contrario se ha de homogenizar al principio en un mezclador.

El aislamiento y la multiplicación de la nueva cepa de hongos se efectúa de la manera siguiente:

15. Dal interior de una esclerótica se extrae esterilmente un pequeño trozo de tejido y se traspasa a agar de mosto de cerveza.

[ Composición: 250 ml de mosto de cerveza clara sin lupulizar (substancia seca 17%), 18g de agar-agar, agua dest. ad 1 litro (pH 5,2) 7. Desarrollase una colonia circular que, después de 14 días a 24°C, alcanza un diámetro de 15 mm. Se compone de una capa de aprox. 1 mm de grosor asentada sobre el agar de estructura pseudoesclerótica y encima un almohadón de micelo de aire blanco. Un colorante marrón difunde dentro del agar. No se forman conidios.

20.

25.

Esta colonia se parte en trozos con una espátula y se traspasa a un tubo de reacción con 12 cm<sup>3</sup> del siguiente sualo de cultivo de agar:

30. Mosto de cerveza 500 ml

303516



- 5.
- |  |      |
|--|------|
| Cornsteep-solids                           | 60 g |
| Acido láctico                              | 1 ml |
| Solución de cloruro amónico hasta un pH de | 4,8  |
| Agar-agar                                  | 20 g |
| Agua dest. ad 1 litro                      |      |

10.

Alrededor de cada trozo de inyección se forma una pequeña colonia de micelo primeramente blanco, más adelante marrón rojizo. Después de 10 días se comienzan a separar conidios en las puntas de hifeno. Después de 20 días existen suficientes conidios para preparar con ellos una suspensión acuosa con la cual se pueden inyectar 20 tubitos de agar inclinado (igual agar que arriba)

15.

Estos cultivos se incuban a 24°C. Los conidios germinan después de 24-36 horas. Después de 6 días está cubierta la superficie de agar igualmente con un fino micelo blanco, después de 10 días se ha formado una capa de micelo gris-marrón, finamente surcada, que asienta estrechamente sobre el agar y tiene solo hifenos de aire cortos. En estos se separan conidios. Después de 20.

12 días se forman en varios lugares en el micelo centros en los cuales se separan pequeñas gotas de un líquido marrón rojizo. Las gotitas alcanzan un diámetro de 1 - 3 mm y se ponen pronto turbias-lechosas de conidios muy numerosos. Después de 16-18 días ha terminado prácticamente la formación de conidios. Un cultivo de agar inclinado en un tubo de reacción de 2 cm de diámetro con 12 ml de clado de agar contiene aprox.  $10^9$  conidios.

25.

30.

Para el cultivo submerso se prepara primeramente un cultivo previo como sigue:



5. Como medio se emplea una solución acuosa al 4,5 % de extracto de malta con un pH de 5,4. Un litro de esta solución se esteriliza en un matraz de Erlenmeyer de 2 litros durante 20 minutos a 110°C, después se inyecta con  $4 \cdot 10^8$  conidios de un cultivo de agar de 17 días de edad y se incuba durante 3 días en una máquina de agitación rotativa a 24°C. Se forma un cultivo denso de finos copos de micelo. Los copos se componen de un ovillo suelto de hifeno y tienen un diámetro de 2 - 4 mm. No se pueden demostrar alcaloides algunos.

10. Para la obtención de mayores cantidades de cultivo previo se inyectan fermentadores de cristal, que contienen 10 litros cada uno del mismo medio, cada vez con  $4 \cdot 10^9$  conidios y se incuba durante 3 días a 23°C bajo ventilación con 6 litros de aire por minuto y agitando a 300 r.p.m. Para combatir la espuma se emplea una emulsión de silicona. Los cultivos del fermentador obtenidos son de igual constitución como los cultivos de agitación. Para el cultivo principal demostró ser especialmente conveniente la siguiente solución de cultivo que,

20. en un litro de agua destilada, contenía:

25.	Sorbita	50 g
	Acido succínico	36 g
	$KH_2PO_4$	2 g
	$MgSO_4$	0,3 g
	$FeSO \cdot 7 H_2O$	1 mg
	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 mg

y con  $NH_4OH$  se había ajustado a un pH de 5,4.

30. Este caldo de cultivo se inyecta con 10% de un cultivo previo de 3 días de edad y en porciones de 100



5. ml se incubaba en matraces de Erlenmeyer de 500 ml en una máquina de agitación recíproca a 23°C. Otros cultivos se cultivan en forma análoga en un fermentador de acero inoxidable que contiene 170 litros de caldo. Se ventila aquí con 170 litros de aire por minuto y se agita al principio con 70, más adelante con 180 r.p.m. Para combatir la espuma se emplea una emulsión de silicona.

10. De esta manera se obtienen cultivos de numerosas partículas de micelo de igual clase. Estas tienen un diámetro de aprox. 5 mm y tienen un núcleo esférico, compacto de aprox. 1 mm diámetro de tejido pseudoparenquimático. Este núcleo lleva apéndices dispuestos en forma de estrella, de aprox. 2 mm de longitud de hifeno dispuesto paralelo. Al final de la duración del cultivo de unos 12 días de duración está el micelo marrón oscuro y el filtrado teñido intensamente marrón rojizo. El valor pH se varía solo inessentialmente.

15. El filtrado de cultivo así obtenido se puede elaborar por ej. como sigue:

20. Una porción de 20 litros de filtrado de cultivo se ponen con aprox. 1,2 kg de sosa a un valor pH de 9,75 y se extrae tres veces, cada una con 20 litros de cloruro etilénico. La fase orgánica se lavó cada vez con 5 litros de agua y después, en vacío, se concentró a un total de 4 litros. El concentrado se extrajo tres veces, cada una con un litro de ácido tártrico al 5%, los extractos ácido tártricos se pusieron con sosa a un pH de 9,0 y se extrajeron tres veces, cada una con 2 litros de cloruro etilénico. Los extractos orgánicos lavados con poca agua y secados sobre sulfato sódico contenían 8 g de

25.

30.

- 8303516



alcaloide total. El análisis de la mezcla de alcaloides así obtenida se efectúa por vía papel-cromatográfica y la parte proporcional de las distintas composiciones se determinó de acuerdo con la identidad de color de la mancha:

5.	Ergobasina	65 %
	Ergobasinina	13 %
	Amida del ácido lisérgico	9 %
	Amida del ácido isolisérgico	5 %
10.	Chanoclavina	4 %
	Elymoclavina	1 %
	Penniclavina	2 %
	Desconocidos	1 %

La ergobasina se puede aislar en forma pura de los extractos orgánicos secados del filtrado del cultivo por cromatografía, recristalización o bajo aprovechamiento de su capacidad formadora de sal por ej. con ácidos orgánicos. De esta manera se pueden obtener de los 8 g de alcaloides total 5,39 g de hidrogenomaleinato de ergobasina en forma cristalina pura.

#### NOTA

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento, se refiere a una Solicitud de Patente, presentada en Suiza, con fecha 29 de agosto de 1963, nº 10.638/63, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en

303516



vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE ERGOBASINA"; caracterizándose por lo siguiente:

5.

1ª.- "Procedimiento para la obtención de ergobasina", caracterizado, porque una de las dos nuevas cepas NRRL 3081 y 3082 de *Claviceps paspali* Stevens et Hall se cultivan seprofiticamente en cultivo submerso y la ergobasina se aísla del filtrado de cultivo en forma en si conocida.

10.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para el cultivo del hongo se emplean sus conidios.

15.

3ª.- Procedimiento para la obtención de ergobasina, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 9 hojas escritas a máquina por una sola cara.

20.

Madrid 27 AGO 1934

SANDOZ, A.G.

GOMEZ ACEBO Y MODER