



PATENTE DE INVENCION.

Case 1853/II.
37/ST/MK.

307219

Memoria Descriptiva

sobre:

" Procedimiento para la producción de ácido
lisérgico ".

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

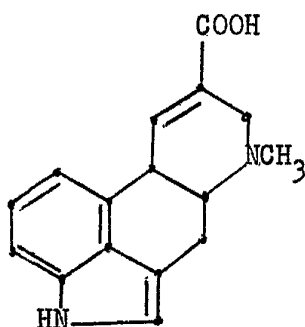
La presente invención se relaciona con un nuevo procedimiento microbiológico.

La presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de un nuevo compuesto heterocíclico, el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico

5.

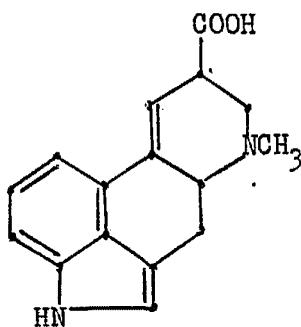


de fórmula I, 307219



I

10. con la ayuda de una nueva cepa de *Claviceps paspali* Stevens et Hall, así como un procedimiento de transposición del compuesto I para formar el ácido lisérgico de fórmula II,



II

20. Se sabía ya que diversas cepas del hongo *Claviceps paspali* Stevens et Hall tienen la capacidad de formar compuestos del tipo alcaloide bajo condiciones de cultivo apropiadas, pero siempre se trataba en estos casos de derivados del ácido lisérgico, un ácido carboxílico heterocíclico largo tiempo conocido, el que inter alia es un componente del alcaloide del cornezuelo de centeno natural. Por lo tanto,

25. fué sorprendente el que se pudiera obtener mediante el cultivo de una nueva cepa de *Claviceps paspali* Stevens et Hall un ácido carboxílico con una estructura como no se había encontrado antes en la naturaleza ni se había producido antes

30. sintética o semisintéticamente.



307219

- Esta nueva cepa, obtenida de esclerocios desarrolados sobre la hierba *Paspalum dilatatum* en los alrededores de Coimbra (Portugal), y de la cual se han depositado muestras en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Ill.,
5. bajo el número NRRL 3080, en contraste con todas las cepas hasta ahora conocidas de *Claviceps paspali* Stevens et Hall, es capaz de formar el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico en cultivo saprofítico como producto principal. Esta nueva cepa de *Claviceps paspali* Stevens et Hall es además capaz de formar conidios in vitro, en lo cual también difiere de todas las cepas de esta especie de hongo hasta ahora descritas (véase por ejemplo Proc. Roy. Soc. Serials B., 155, 33).
 10. Para la ejecución de procedimientos microbiológicos en escala técnica es de suma importancia si el hongo en cuestión es capaz o no de formar conidios. Así es posible con la ayuda de conidios hacer aislamientos de una sola espóra y obtener, por lo tanto, un material genéticamente uniforme. También es mucho más fácil obtener y aislar mutantes de los conidios mediante rayos X o rayos ultravioleta así como con agentes químicos, que del micelio estéril. Además se pueden infestar plantas de *Paspalum* en flor con conidios y obtenerse así esclerocios sobre el huésped natural, los que son extraordinariamente apropiados para la conservación de la cepa. Por ejemplo, se puede en todo momento obtener material de inoculación fresco de este material durable cuando los cultivos in vitro han degenerado después de pasajes repetidos. Los conidios también pueden ser liofilizados o almacenados por un
 15. tiempo ilimitado después del secado a congelación, lo que
 - 20.
 - 25.
 - 30.

- 307219



1964

también posibilita la conservación de una cepa. Finalmente, una suspensión de conidios es la más apropiada para la inoculación de una solución nutritiva ya que se puede dosificar mejor la cantidad del material inoculado y porque es más fácil con ella trabajar en forma estéril (un micelio estéril, sin embargo, tiene que ser homogeneizado primero en una mezcladora).

5.

Se puede obtener una serie de nuevos derivados con propiedades farmacológicas valiosas del ácido 6-metil-
10. $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico, obtenido según el procedimiento del invento, por un método semisintético.

10.

Además, mediante un determinado procedimiento, el cual también forma parte de la presente invención, puede convertirse el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico en ácido lisérgico con un buen rendimiento y en forma muy sencilla, siendo el ácido lisérgico de gran importancia como intermedio para la producción de valiosos medicamentos, así por ejemplo los oxitócicos ergobasina y metilergobasina, de gran uso clínico, y el hasta ahora más fuerte antagonista de la serotonina, la (+)-butanolamida-(2')
15. del ácido l-metil-d-lisérgico.

15.

20.

El aislamiento y la multiplicación de la nueva cepa de *Claviceps paspali* Stevens et Hall NRRL 3080 puede efectuarse del modo siguiente por ejemplo:

25.

Se separa una pequeña porción de tejido en forma estéril del interior de un esclerocio y se traslada a un agar de mosto de cerveza.

30.

[Composición: 250 ml de mosto de cerveza claro sin lúpulo (substancia seca 17%), 18 g de agar - agar, agua destilada hasta completar un litro (valor pH 5.2)].



Se desarrolla una colonia en forma de círculo, la que alcanza un diámetro de 15 mm después de 14 días a 24° C. Esta colonia consiste de una membrana de aproximadamente 1 mm de espesor, de estructura pseudoesclerótica, que descansa sobre el agar y encima de ella un almohadillado de micelio de aire blanco. Un colorante pardo se difunde en el agar. Se forman pequeños conidios.

5.

Se divide esta colonia en pedazos con una espátula y se traslada a un matraz con 12 cm³ del siguiente caldo de cultivo de agar:

10.

- Mosto de cerveza 500 ml
- Cornsteep Solids 60 g
- Acido láctico 1 ml
- Solución de cloruro amónico hasta un valor pH de 4.8

15.

- Agar - agar 20 g
- Agua destilada hasta completar un litro

Alrededor de cada porción inoculada se forma una pequeña colonia, primero de micelio blanco, luego de micelio pardo rojizo. Después de 10 días comienzan a formarse los conidios en las puntas de las hifas. Después de 20 días hay una cantidad suficiente de conidios para producir con ellos una suspensión acuosa, con la cual pueden inocularse 20 tubos de agar inclinados (el mismo agar arriba indicado). Estos cultivos se incuban a 24°C. Los conidios germinan después de 24 a 36 horas. Después de 6 días, la superficie del agar queda cubierta uniformemente por un micelio blanco, fino, después de 10 días se ha formado una capa de micelio, pardo grisácea con finos surcos, la que cubre el agar compactamente y solo tiene cortas hifas de aire. En éstas se forman los conidios. Después de 12 días, se forman centros en diversas partes del mi-

20.

25.

30.

- 6 307219



celio, los cuales secretan pequeñas gotas de un líquido par-
do rojizo. Las gotitas alcanzan un diámetro de 1 a 3 mm y
pronto se vuelven lechosas por un gran número de conidios.

Después de 16 a 18 días, la formación de conidios queda prác-
ticamente finalizada. Un cultivo de agar inclinado en un ma-
traz de 2 cm de diámetro con 12 ml de caldo de cultivo de
5. agar contiene aproximadamente 10^9 de conidios.

Para el cultivo sumergido se prepara primero un cul-
tivo preliminar como sigue:

10. Como medio de cultivo se emplea una solución acuosa de extracto de malta al 4.5% con un valor pH de 5. Se esteriliza un litro de esta solución en un matraz Erlenmeyer de 2 litros durante 20 minutos a 110° C, luego se inocula con $6 \cdot 10^8$ de conidios de un cultivo de agar de 15 días y se incuba durante 3 días sobre un aparato agitador rotatorio a 24° C. Se forma un cultivo denso de hojuelas finas de micelio. Las hojuelas consisten de un ovillo flojo de hifas y tienen un diámetro de 2 a 4 mm. No se puede comprobar la presencia de alcaloides.
15. Para producir grandes cantidades de cultivo preliminar, se inoculan fermentadores de vidrio conteniendo cada uno 10 litros del mismo medio de cultivo, con $6 \cdot 10^9$ de conidios cada uno, y se incuban durante 3 días a 23° C mientras se introduce aire a razón de 6 litros de aire por minuto y agitándose a razón de 300 revoluciones por minuto. Para controlar la formación de espuma se utiliza una emulsión de sílice. Los cultivos en fermentadores, así obtenidos, son de naturaleza igual a la de los cultivos agitados. Para el cultivo principal resulta especialmente adecuada la solución de cultivo siguiente, conteniendo en un litro de agua destilada:
- 20.
- 25.
- 30.



307219

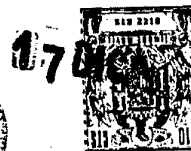
	Sorbitol	50 g
	Acido succínico	36 g
	KH_2PO_4	2 g
	$MgSO_4$	0.3 g
5.	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	1 mg
	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 mg

la que ha sido ajustada a un valor pH de 5.4 con NH_4OH .

Se inoculara esta solución de cultivo con 10% de un cultivo preliminar de 3 días y se incubaba en porciones de 100 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml sobre un aparato agitador con movimiento de vaivén a 23° C. Otros cultivos se cultivan en forma análoga en un fermentador de acero inoxidable, conteniendo 170 litros de caldo de cultivo, introduciéndose 170 litros de aire por minuto y agitándose primero con 70, luego con 180 revoluciones por minuto. Para controlar la formación de espuma se usa una emulsión de sílice.

De este modo se obtienen cultivos de un gran número de partículas de micelio del mismo tipo. Estas partículas tienen un diámetro de aproximadamente 5 mm y poseen un núcleo esférico, de un diámetro de aproximadamente 1 mm, consistente de tejido pseudoparenquimatoso. Este núcleo está provisto de prolongaciones en forma de estrella, de aproximadamente 2 mm de largo, consistentes de hifas paralelas. Al final de un período de cultivo de aproximadamente 10 días, el micelio tiene un color pardo oscuro y el filtrado un color pardo rojizo intenso. Sólo hay un cambio insignificante en el valor pH.

El filtrado de cultivo obtenido en esta forma tiene un contenido total de alcaloides, colorimétricamente de-



terminado, de 620 mg por litro, basado en un peso molecular de 300. La composición de la mezcla de alcaloides, determinada por la cromatografía en papel, es como sigue:

5.	Acido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico y pequeñas cantidades de ácido lisérgico y de ácido isolisérgico	} 86.5 %
	Amida del ácido lisérgico	3.9 %
	Amida del ácido isolisérgico	3.9 %
	Ergobasina	1.0 %
10.	Ergobasinina	0.5 %
	Alcaloides de clavina	4.2 %

15. El ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico puede en principio ser aislado del filtrado de cultivo mediante diversos métodos. Preferentemente se extrae del filtrado de cultivo mediante un intercambiador de cationes, por ejemplo Dowex 50 o Amberlite IR 120, se separa de éste por tratamiento con amoníaco diluído y se hace cristalizar concentrando el producto de la elución y ajustando el valor pH de la solución a su punto isoeléctrico.

20. El ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico, así obtenido, puede ser convertido en ácido lisérgico mediante tratamiento con reactivos básicos o también por simple calentamiento. Es ventajoso por ejemplo, calentar hasta 100° una solución del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico en solución acuosa diluída de hidróxido sódico durante algún tiempo, después de lo cual se enfría la solución y se ajusta el valor pH de la misma al punto isoeléctrico del ácido lisérgico.

30. El filtrado de cultivo también puede ser trabajado directamente para dar ácido lisérgico, por ejemplo como



sigue: después de concentrar el volumen de la solución por evaporación, se separa el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del residuo por extracción con una solución alcohólica de amoníaco, seguidamente se isomeriza el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico por calentamiento del extracto para dar ácido lisérgico y se aísla éste de la solución en la forma arriba descrita.

Sin embargo, también se puede calentar la solución amoniacal del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico directamente o después de la adición de lejía, después de haber trabajado el filtrado de cultivo mediante un intercambiador de iones, con lo cual se produce la isomerización para formar el ácido lisérgico.

(En los siguientes ejemplos no limitativos todas las temperaturas están indicadas en grados centígrado; los puntos de fusión son corregidos.)

EJEMPLO 1: Acido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico.

Se filtran 5 litros de filtrado de cultivo de la nueva cepa de *Claviceps paspali* Stevens et Hall con un contenido total de derivados ergolínicos, colorimétrica - mente determinado, de aproximadamente 500 mg por litro (basado en un peso molecular de 300) y de un valor pH de 5.6, a través de una columna lavada con agua de 500 g de Amberlite IR 120 (forma H⁺; diámetro de la columna 2.8 cm; altura 115 cm). La velocidad del flujo es de 500 ml por hora. Después de lavar la columna con 1 litro de agua, se eluye el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico con amoníaco al 5 %. Se examina el material eluído, reunido en fracciones de 500 ml cada una, mediante la fluorescencia en luz ultravioleta y la reacción cromática de Keller (FeCl₃ -



- ácido acético glacial, H_2SO_4 conc.) para determinar el contenido de derivados ergolínicos. Las primeras cuatro fracciones (2 litros en total) se concentran por evaporación a 13 mm Hg y a una temperatura de baño de 30°
5. hasta un volumen de 500 ml, se ajusta el valor pH de la solución a 5.5 con ácido acético glacial, se separa la resina precipitada por filtración (reacción cromática de Keller negativa), se concentra el filtrado en un vacío hasta aproximadamente 25 ml, se añade 20 ml de metanol, se
10. hierve la solución por corto tiempo y se deja reposar a 5° por espacio de algunas horas. El ácido que cristaliza, después de haber sido filtrado, es lavado con agua y metanol y secado en un vacío a 80° durante 2 horas. Las siguientes siete fracciones del material eluido con amoníaco, proporcionan una cantidad adicional de ácido 6-metil-
15. $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico cristalino, después de ser trabajadas en forma análoga.

- Con fines de purificación del ácido bruto, se reúnen los productos cristalizados y se disuelven en amoníaco alcohólico al 5 %. Se filtra la solución y se ajusta a un valor pH de 5.5 con ácido acético 2 N y se calienta durante corto tiempo sobre un baño de maría. Después de algunas horas se separa el ácido cristalino por filtración, se lava con agua y metanol y se seca en un vacío a 80° C.
20. Punto de fusión 243-245° (descomposición) ; $[\alpha]_D = -180^\circ$ (en solución de hidróxido sódico 0.1 N). Reacciones cromáticas de Keller, van Urk y Ehrlich iguales como con el ácido lisérgico; cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice con alcohol/amoníaco al 25 % (9:1) como agente de elución: valor $R_f = 0.4$ a 0.45. La mancha da una colo-
- 25.
- 30.

304219
307219



ración azul al ser rociada con reactivo de Ehrlich. Espectro ultravioleta en NaOH 0.1 N: λ_{max} μ /log ξ = 217.5/4.56; 282/3.79; 292/3.74, mínimo a 252 μ . Espectro infrarojo: bandas características a 3340, 2275 (ancha), 1674 y 1580 cm^{-1} (en Nujol).

5.

Clorhidrato: El clorhidrato producido del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico arriba descrito, con ácido clorhídrico diluído, fué recristalizado de agua y ácido clorhídrico diluído: punto de fusión 257-259° (descomposición); $[a]_D = -176^\circ$ (en HCl 0.1 N). Espectro ultravioleta igual al del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico. Espectro infrarojo: bandas características a 3380, 2600, 1708, 1660 (débil) y 1606 (débil) cm^{-1} (en Nujol).

10.

Acido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del clorhidrato.

15.

Se añade por gotas solución de bicarbonato sódico 2 N a una suspensión de 100 mg de clorhidrato en 5 ml de agua mientras se agita hasta que toda la substancia queda disuelta. Seguidamente se ajusta el valor pH a 5.5 con ácido acético glacial, se hierve por corto tiempo, se separa el ácido cristalizado por filtración después de algunas horas, se lava éste con agua y metanol y se seca en un vacío a 80°. Punto de fusión 245-247° (descomposición); $[a]_D = -208^\circ$ (en NaOH 0.1 N). En la cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice con alcohol/amoniaco al 25 % (9:1) el compuesto es uniforme. Valor $R_f = 0.45$. La mancha no muestra prácticamente fluorescencia alguna en la luz ultravioleta y da una coloración azul al ser rociada con reactivo de Ehrlich.

20.

25.

EJEMPLO 2: Acido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico.

30.

Para obtener el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del filtrado de cultivo de la nueva cepa de

307210¹² -



5. Claviceps paspalum se procede en forma analoga a la descrita en el ejemplo 1, excepto que en lugar de Amberlite IR 120 se usa el intercambiador de cationes Dowex 50. Se obtiene el ácido 6-metil-4^{8,9}-ergolen-8-carboxílico cristalizado, bruto, con las propiedades indicadas en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3: Acido lisérgico.

10. Se calientan 500 mg de ácido 6-metil-4^{8,9}-ergolen-carboxílico cristalino, bruto, aislado del filtrado de cultivo de la nueva cepa Claviceps paspalum en la forma descrita en el ejemplo 1, en 10 ml de solución de hidróxido sódico 2 N sobre un baño de maría durante 2 horas, se trata la solución caliente con carbón activo y se ajusta el filtrado a un valor pH de 5.5 con ácido clorhídrico diluído y ácido acético glacial. Después de algunas horas se separa el ácido lisérgico cristalizado por filtración, se lava con metanol y agua y se seca en un vacío a 80°: punto de fusión 245-247° (descomposición).

20. El ácido lisérgico obtenido en tal forma tiene todas las propiedades químicas y físicas descritas en la literatura en relación con este compuesto.

307219 N O T A.

17



Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que el procedimiento anteriormente indicado es susceptible de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren sus principios fundamentales. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de Patente presentada en Suiza nº 10637/63, con fecha de 29 de agosto de 1963, nº 13053/63, con fecha de 24 de octubre de 1963, acogiéndose por lo tanto, a los beneficios que conceden los convenios internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, para " Procedimiento para la producción de ácido lisérgico "; caracterizándose por lo siguiente:

1.- Procedimiento para la producción de ácido lisérgico, caracterizado porque se transpone el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico mediante tratamiento con una base o mediante calentamiento.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se trata el ácido ergolen-carboxílico con un hidróxido de metal alcali.

3.- "Procedimiento para la producción de ácido lisérgico"; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

SANDOZ, S. G.

J. GOMEZ ACEBO Y MOSE

17 DIC. 1964