

337720

1er. CERTIFICADO DE ADICION

Case 1880/A.

37/KU/MK.

=====



*Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 303.518, concedida el 30 de enero de 1.965, por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 6-METIL- $\Delta$ <sup>8,9</sup>-ERGOLEN-8-CARBOXILICO".

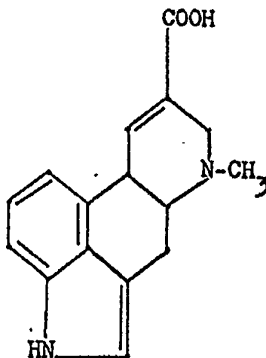
- - - - -

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

- - - - -

La presente invención se relaciona con un procedimiento para la producción del ácido - 6-metil- $\Delta$ <sup>8,9</sup>-ergolen-8-carboxílico de fórmula,

337729



y/o ácido lisérgico e isolisérgico; es una mejora o modificación del  
invento en la Solicitud de Patente en España No. 303,518, que describe  
y reivindica un procedimiento para la producción del ácido 6-metil-  
 $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico y/o ácido lisérgico e isolisérgico  
5 mediante cultivo saprofito de una nueva cepa de hongo de la  
especie Claviceps paspali Stevens et Hall mediante la técnica de  
cultivo sumergido o cultivo en fermentadores y subsiguiente extracción  
del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del filtrado de cultivo  
en forma de por sí conocida, y si se desea, isomerización de dicho  
10 ácido al ácido lisérgico. Esta nueva cepa de hongo es capaz de formar  
conoidios in vitro y ha sido depositada en el Departamento de Agricultura  
de los Estados Unidos (Northern Utilization Research and Development  
Division), Peoria, Ill., bajo la referencia NRRL 3080.

Se ha encontrado ahora que mediante la irradiación de esta  
15 cepa de hongo NRRL 3080 con rayos ultravioleta y/o rayos X y/o  
tratamiento con imina etilénica en forma de por sí conocida, es posible  
obtener mutantes que son capaces de formar mayores cantidades del ácido  
6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico que la cepa original. Una de estas  
mutantes ha sido depositada en el Departamento de Agricultura de los  
20 Estados Unidos (Northern Utilization Research and Development Division),  
Peoria, Ill., bajo la referencia NRRL 3167.

337729



Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico y/o ácido lisérgico e isolisérgico, caracterizado porque se cultiva una mutante de la cepa de *Claviceps paspali* Stevens et Hall NRRL 3080 en un medio nutritivo y se aísla el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del mismo, y cuando se desea, se isomeriza dicho ácido al ácido lisérgico.

De acuerdo con un método del invento se cultiva la mutante NRRL 3167 en un medio nutritivo y se aísla el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del mismo.

Debe tenerse presente que la isomerización del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico proporciona ácido lisérgico. Sin embargo, el ácido lisérgico, en su forma libre, a su vez, se sigue isomerizando hasta que se obtiene una mezcla equilibrada de los ácidos lisérgico e isolisérgico. Por lo tanto, también es posible aislar el ácido isolisérgico de acuerdo con el presente invento.

El ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico obtenido mediante el nuevo procedimiento puede ser usado para preparar en forma semi-sintética una cantidad de nuevos derivados con valiosas propiedades farmacológicas.

De acuerdo con un aspecto del invento se convierte el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico con un buen rendimiento mediante tratamiento con una base, preferentemente con calentamiento, en el ácido lisérgico, el que es de importancia considerable como producto intermedio para la producción de valiosos medicamentos, inter alia, por ejemplo, los oxitócicos de extendido uso clínico ergobasina y metilergobasina, y la (+)-butanolamida-(2') del ácido l-metil-D-lisérgico, el antagonista de la serotonina más potente que se conoce.

- 4 -  
337729

El aislamiento y la propagación de la nueva mutante NRRL 3167 de la especie *Claviceps paspali* Stevens et Hall puede, por ejemplo, efectuarse como sigue:

Una colonia cultivada sobre una placa de agar de malta es  
5 partida en fracciones con una espátula; estas fracciones se trasladan a un tubo de ensayo conteniendo 12 cc del siguiente medio de cultivo de agar:

	mosto de cerveza	500 ml
	cornsteep solids	60 g
10	ácido láctico	1 ml
	solución de cloruro amónico hasta pH 4.8	
	agar-agar	20 g
	agua destilada hasta completar	1 litro

Alrededor de cada porción inoculada se forma una  
15 pequeña colonia, primero de micelio blanco, luego de micelio pardo rojizo. Después de 10 días comienzan a formarse los conidios por constricción en las puntas de las hifas. Después de 20 días hay una cantidad suficiente de conidios para preparar con ellos una suspensión acuosa, con la cual pueden inocularse 20 tubos de agar inclinados  
20 (conteniendo 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, y después de 10 días se ha formado una  
25 capa de micelio, pardo grisácea, con finos surcos, la que está en estrecho contacto con el agar y solo tiene hifas aéreas cortas, de las cuales se forman conidios por constricción. Después de 12 días, aparecen centros en diversas partes del micelio, los cuales secretan

- 5 -  
337729



1880/A

pequeñas gotas de un líquido pardo rojizo. Las gotitas alcanzan un diámetro de 1 a 3 mm y pronto se vuelven turbias debido a la presencia de un gran número de conidios. Después de 16 a 18 días, la formación de conidios queda prácticamente finalizada. Un cultivo de agar inclinado  
5 en un tubo de ensayo con un diámetro de 2 cm, llenado con 12 ml de medio de cultivo de agar (composición de la solución de agar igual a la arriba indicada) contiene aproximadamente  $10^9$  de conidios.

Para el cultivo mediante la técnica de cultivo sumergido, se prepara primero un cultivo preliminar como sigue:

10 Como medio de cultivo se emplea una solución acuosa de extracto de malta al 4.5 % con un pH de 5.4. Se esteriliza un litro de esta solución durante 20 minutos a  $110^{\circ}\text{C}$  en un matraz Erlenmeyer de 2 litros, y 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  
15 rotatorio a  $24^{\circ}\text{C}$ . Se forma un cultivo denso de finas hojuelas de micelio, consistiendo cada hojuela de un racimo flojo de hifas con un diámetro de 2 a 4 mm. No se puede comprobar la presencia de alcaloides.

Para producir grandes cantidades de cultivo preliminar, se inoculan fermentadores de vidrio conteniendo cada uno 10 litros del  
20 mismo medio, con  $6 \cdot 10^8$  de conidios cada uno y se incuban durante tres días a  $23^{\circ}\text{C}$  mientras se introduce aire a razón de 6 litros de aire por minuto y se agita a razón de 300 revoluciones por minuto. Para inhibir la formación de espuma se añade una emulsión de silicona. Los cultivos de fermentación resultantes son idénticos a los cultivos con  
25 agitación.

Se han obtenido resultados particularmente buenos en la preparación del cultivo principal con las siguientes soluciones nutritivas que contienen en un litro de agua destilada



10 MAR. 1957

# 337729

	solución nutritiva A	solución nutritiva B
	50 g	100 g
5 sorbitol	36 g	36 g
ácido succínico	2 g	2 g
$PO_4H_2K$	0.3 g	0.3 g
$SO_4Mg$	1 mg	1 mg
$SO_4Fe \cdot 7 H_2O$	10 mg	10 mg
$SO_4Zn \cdot 7 H_2O$		

10 y que han sido ajustadas a un pH de 5.4 con  $NH_4OH$ .

Se inocula la solución nutritiva A con 10 % de un cultivo preliminar de 3 días y se incuba en porciones de 100 ml cada una en matraces Erlenmeyer de 500 ml a 23°C sobre un aparato agitador con movimiento de vaivén. Puede efectuarse un cultivo a gran escala en forma similar en un recipiente de fermentación de acero inoxidable que contiene 170 litros de medio nutritivo, introduciéndose 170 litros de aire por minuto y agitándose, primero con 70 y luego con 180 revoluciones por minuto. Se inhibe la formación de espuma con la adición de una emulsión de silicona.

20 De este modo se obtienen cultivos de un gran número de partículas de micelio idénticas; éstas tienen un diámetro de aproximadamente 5 mm y poseen un núcleo esférico, compacto, con un diámetro de aproximadamente 1 mm, consistente de tejido pseudoparenquimatoso. Este núcleo tiene extensiones radiales de aproximadamente 2 mm de largo, arregladas en forma de estrella, consistiendo de hifas paralelas. Al finalizarse el cultivo después de aproximadamente 10 días, el micelio tiene un color pardo oscuro y el filtrado un color pardo rojizo intenso. Solo hay un cambio insignificante en el valor pH.

337729 MAR 1967

El contenido total de alcaloides del filtrado de cultivo  
 obtenido en esta forma fué determinado mediante la colorimetría  
 (calculado sobre un peso molecular de 300). La composición de la mezcla  
 de alcaloides fué determinada por la cromatografía sobre papel, y los  
 5 valores obtenidos se indican a continuación.

Método	Contenido total de alcaloides mg/litro del filtrado de cultivo	Composición de la mezcla de alcaloides	
		ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico	alcaloides de clavina
cultivo agitado	3300	89 %	11 %
cultivo en fermentadores	2480	93 %	7 %

El ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico puede ser aislado del filtrado de cultivo en diversas formas. Ventajosamente se extrae del filtrado de cultivo con una resina intercambiadora de cationes fuertemente ácida [por ejemplo Dowex 50 (Marca Registrada) o Amberlite  
 10 IR 120 (Marca Registrada)], se eluye luego de la resina mediante tratamiento con amoníaco diluido, se evapora el producto de la elución, se ajusta el valor pH de la solución a su punto isoelectrico y luego se deja cristalizar el producto.

El ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico obtenido en esta  
 15 forma puede ser convertido en ácido lisérgico mediante tratamiento con una base, preferentemente un hidróxido de metal alcalino, y preferentemente con calentamiento. Por ejemplo, es ventajoso calentar una solución del ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico en solución diluida acuosa de hidróxido sódico durante algún tiempo a 100°C,

337729



después de lo cual se enfría la solución y se ajusta su valor pH al punto isoeléctrico del ácido lisérgico.

Alternativamente puede trabajarse el filtrado de cultivo directamente para proporcionar ácido lisérgico, por ejemplo en la forma siguiente: Se evapora la solución, se extrae el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del residuo con una solución alcohólica de amoníaco, se calienta el extracto para isomerizar el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico al ácido lisérgico y luego se aísla éste de la solución en la forma arriba descrita.

Alternativamente puede pasarse el filtrado de cultivo sobre una resina intercambiadora de iones y eluirse el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del mismo con amoníaco, y calentarse la solución amoniacal, ya sea como tal o en mezcla con una solución alcalina, de modo que se isomeriza el ácido carboxílico al ácido lisérgico.

La expresión "en forma de por sí conocida" tal como se usa aquí designa métodos en uso o descritos en la literatura sobre el asunto.

En los siguientes Ejemplos no limitativos todas las temperaturas están indicadas en grados Centígrado; los puntos de fusión son corregidos.





- 9 -  
337729

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

Se filtran 5 litros de filtrado de un cultivo de la nueva cepa de Claviceps paspali Stevens et Hall NRRL 3167 (contenido total de derivados ergolínicos, colorimétricamente determinado, de aproximadamente 3300 mg/litro, asumiendo un peso molecular promedio de 300) con un valor pH de 5.6, a través de una columna conteniendo una suspensión acuosa de 3500 g de Amberlite IR 120 (forma H+; diámetro de la columna 2.8 cm, altura 115 cm). El líquido pasa a una velocidad de 500 ml por hora. Se lava la columna con 6 litros de agua y se eluye el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico con amoníaco al 5%. Se recoge el material eluido en fracciones de 500 ml cada una y se examina mediante la fluorescencia en luz ultravioleta y la reacción cromática de Keller (cloruro férrico/ácido acético glacial en ácido sulfúrico concentrado) para determinar el contenido de derivados ergolínicos. Las primeras cuatro fracciones (2 litros en total) se concentran por evaporación hasta un volumen de 500 ml bajo una presión de 13 mm de Hg en un baño a 30°, 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 añaden 20 ml de metanol, se hierve la solución por corto tiempo y luego se deja reposar a 5° durante varias horas. Se separa el ácido que cristaliza por filtración, se lava con agua y metanol y se seca en un vacío a 80° durante 2 horas. Las siguientes 7 fracciones del material eluido con amoníaco proporcionan una cantidad adicional de ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico cristalino después de ser trabajadas en forma análoga.



337729

Con fines de purificación del ácido bruto, se reúnen los productos cristalinos y se disuelven en amoníaco alcohólico al 5%. Se filtra la solución, se ajusta su valor pH a 5.5 con ácido acético 2 N y se calienta durante corto tiempo en 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°. P.F. 243-245° (descomp.);  $[\alpha]_D = -180^\circ$  (hidróxido sódico 0.1 N).

Clorhidrato: P.F. 257-259° (descomp.);  $[\alpha]_D = -176^\circ$  (en ClH 0.1 N).

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

Para producir el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del filtrado de un cultivo de la nueva cepa de Claviceps paspali NRRL 3167 se adopta el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, excepto que se usa la resina intercambiadora de cationes Dowex 50 en lugar de Amberlite IR 120. El ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico bruto, cristalino resultante tiene las propiedades descritas en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3: Acido lisérgico.

Se evaporan en un baño de maría 10 litros de filtrado de cultivo obtenido en forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1 y se extrae el residuo con 3 veces 500 ml de una solución alcohólica de amoníaco al 5% mientras se calienta a aproximadamente 50°. Se concentra el extracto hasta la mitad de su volumen inicial en un evaporador rotatorio, se ajusta el valor pH de la solución concentrada resultante a 5.5 con ácido acético glacial, se trata con carbón activo y se concentra el filtrado en un vacío hasta un volumen de aproximadamente 20 ml, con lo cual comienza la cristalización. Se deja reposar la



337729

solución a 5° durante varias horas, se separa la precipitación por filtración, se lava con agua y metanol, se seca a 80° y se purifica mediante recristalización o reprecipitación. El ácido lisérgico resultante tiene un P.F. de 245-247° y es idéntico al compuesto descrito en la literatura.

EJEMPLO 4: Acido lisérgico.

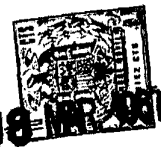
Se tratan 10 litros de filtrado de cultivo obtenido en forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1 con 500 g de Amberlite IR 120 (forma H+) mientras se agita durante aproximadamente 12 horas, se separa la resina intercambiadora de iones por filtración y se trabaja el filtrado nuevamente en la forma arriba descrita usando 250 g de la misma resina intercambiadora de cationes. Una muestra ( 5 ml) de la solución de cultivo obtenida después de tratar 2 veces con la resina intercambiadora da una reacción negativa al reactivo cromático de Keller después de la evaporación hasta sequedad. Se agita cada una de las 2 porciones de resina intercambiadora de iones 2 veces con la misma cantidad por peso de agua durante 4 horas. Luego se trata cada porción de resina intercambiadora de iones 3 veces con la misma cantidad por peso de una solución acuosa de amoníaco al 5 % en ausencia de dióxido de carbono a 5-10° durante 12 horas. Se concentran los extractos individuales hasta la mitad de su volumen inicial en un baño de maría a aproximadamente 100° en un evaporador rotatorio, se ajusta el valor pH de los concentrados a 5.5 con ácido acético glacial, se separan opcionalmente por filtración pequeñas cantidades de resina precipitada y se concentra en un vacío hasta 15-20 ml. Se aísla y purifica el ácido lisérgico en forma análoga a la descrita en el Ejemplo 3. [fuertemente ácidas,] Pueden usarse otras resinas intercambiadoras de iones por ejemplo Dowex 50, en lugar de la resina intercambiadora de iones arriba usada.

337729  
N O T A



- 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 -
5. modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente -
10. presentada en Suiza con fecha 10 de marzo de 1.966, bajo el número 3455/66, acogiéndose por tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita ler. Certificado de Adición en España sobre: "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 303.518,
15. CONCEDIDA EL 30 DE ENERO DE 1.965, POR: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 6-METIL- $\Delta$ <sup>8,9</sup>-ERGOLLEN-8-CARBOXILICO"; caracterizándose por lo siguiente:
20. 1ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 303.518, concedida el 30 de enero de 1.965, por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 6-METIL- $\Delta$ <sup>8,9</sup>-ERGOLLEN-8-CARBOXILICO, caracterizadas porque se cultiva una mutante de
25. la cepa de Claviceps paspali Stevens et Hall NRRL 3080 en un medio nutritivo y se aísla el ácido 6-metil- $\Delta$ <sup>8,9</sup>-ergolen-8-carboxílico del mismo.
30. 2ª.- Mejoras, según la reivindicación 1, caracterizadas porque se cultiva la mutante NRRL 3167 en un medio nutritivo y se aísla el ácido

337729



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

5. 3ª.- Mejoras, según cualquiera - de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizadas porque se inocula el medio nutritivo con conidios de la mutante.

10. 4ª.- Mejoras, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque se aísla el ácido 6-metil- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carboxílico del medio de cultivo filtrado mediante absorción sobre una resina intercambiadora de iones fuertemente ácida y se eluye a continuación con solución de amoníaco.

15. 5ª.- Mejoras introducidas en el - objeto de la patente principal nº 303.518, concedida el 30 de enero de 1.965, por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 6-METIL- $\Delta^{8,9}$ -ERGOLEN-8-CARBOXILICO"; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

20. Esta Memoria consta de trece hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,  
SANDOZ, A.G.,

18 MAR. 1967

J. GOMEZ ACEBO Y MODAT  
p. g. Firmado: F. Hernández Ruiz