УДК 615.32:582.282

Пути получения нейрогормональных препаратов эргопептидного ряда

Е. Н. Звонкова, С. С. Шаин, Е. С. Сайбель

ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА ЗВОНКОВА — доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией алкалоидов Всероссийского института лекарственных и ароматических растений РАСХН (ВИЛАР). Область научных интересов: пептидные алкалоиды.

СЕРГЕЙ СЕМЕНОВИЧ ШАИН — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела биотехнологии ВИЛАР. Область научных интересов: физиология и биотехнология растений.

ЕГОР СЕРГЕЕВИЧ САЙБЕЛЬ — аспирант ВИЛАР, технолог фитохимического цеха ЗАО «Фармцентр ВИЛАР». Область научных интересов: технология переработки спорыньи и модификации эргоалкалоидов.

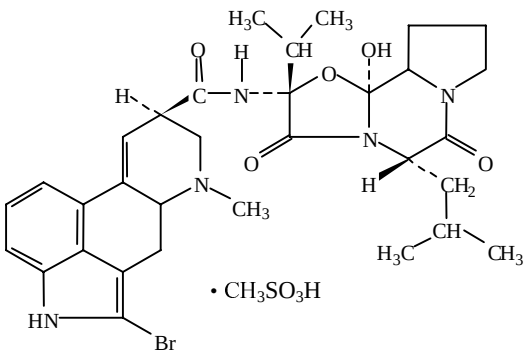
117216 Москва, ул. Грина, 7, ВИЛАР РАСХ, E-mail vilar_russia@bk.ru

Система гипоталамо-гипофизарной гормональной регуляции, осуществляющая контроль за секрецией таких гормонов передней доли гипофиза как пролактин и соматотропин, является мишенью для действия ряда агонистов дофамина, главным образом взаимодействующих с D_2-рецепторами. Наиболее эффективным соединением этого типа в клинической практике оказался бромированный алкалоид из спорыньи — 2-бром-α-эргокриптин **1** [1] (бромкриптин, бромэргон, СВ-154, провидел, парлодел), введенный в медицинскую практику фирмой «Sandoz», Швейцария [2]. Препараты на основе соединения **1**: уменьшают секрецию пролактина и повышенную секрецию соматотропного гормона, подавляют физиологическую лактацию, нормализуют менструальную функцию, замедляют рост пролактиномы, уменьшают размеры и количество кист в молочной железе при маститах и мастопатиях, оказывают влияние на пост- и пресинаптические дофаминовые рецепторы подкорковых ядер, давая противопаркинсонический эффект и увеличивая двигательную активность.

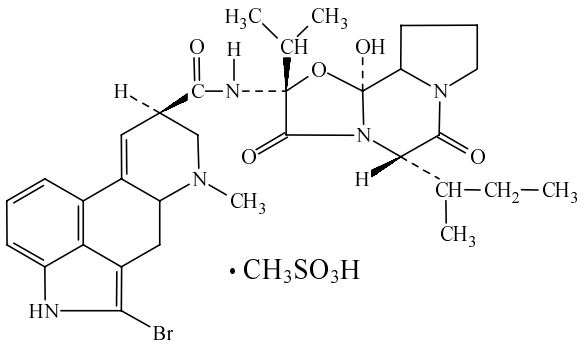
Их применяют при лечении гиперпролактинэмии и аденом, вырабатывающих пролактин, бесплодия у мужчин и женщин, акромегалии, для торможения лактации после родов, после абортов, при маститах и масталгии, а также при паркинсонизме.

За последние 15—20 лет был проведен обширный скрининг природных, полусинтетических и синтетических аналогов 2-бром-α-эргокриптина. Его результаты могут быть проиллюстрированы на примере соединений **2**—**8**, которые представляют собой вещества, успешно прошедшие клинические или предклинические исследования и продемонстрировавшие свойства ингибиторов секреции пролактина. Среди них выпускаемые препараты: Абергин (соединения **1**+**2**) [2, 3], Норпролак (на основе соединения **3**) [2], Достинекс (на основе соединения **4**) [2, 4]; вещества, прошедшие клинические испытания: лизурид (**5**) [5], тергурид (**6**) [6] и соединения, рекомендованные к дальнейшему подробному изучению (**7**, **8**) [7, 8].

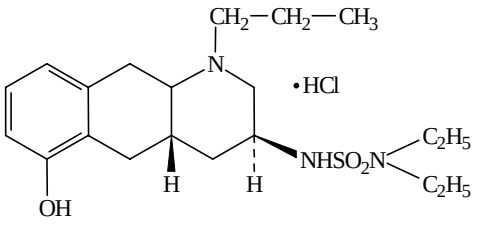
Рассмотрение структур **1**—**8**, выбранных нами из огромного количества предложенных агонистов



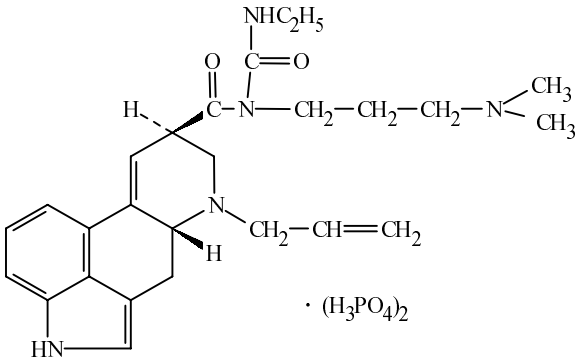
2-Бром-α-эргокриптин мезилат **1**
2-Бром-α-эргокриптин основание **1а**



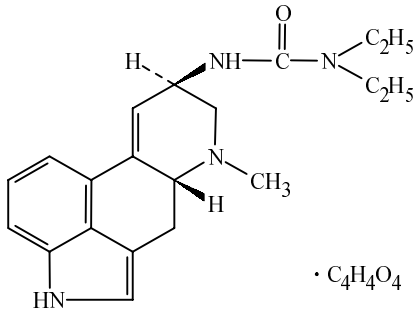
2-Бром-β-эргокриптин мезилат **2**



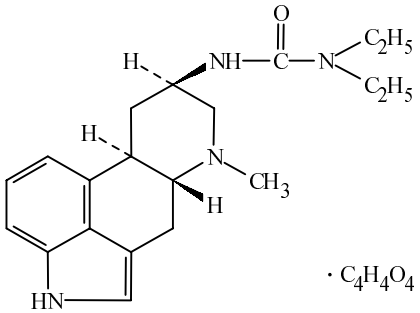
Квинаголид гидрохлорид **3**



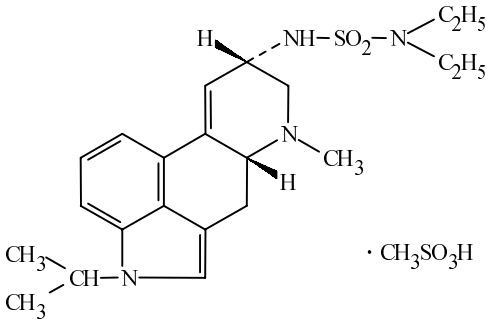
Каберголин фосфат **4**



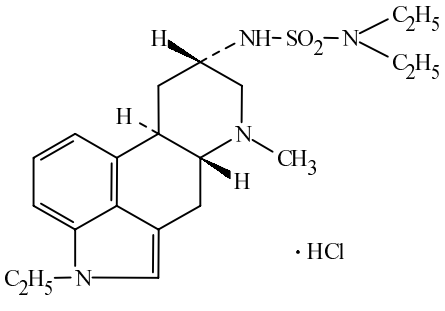
Лизурид гидромалеат **5**



Тергурид гидромалеат **6**



7

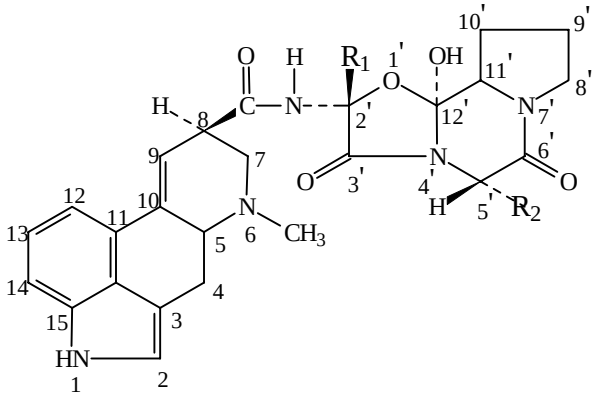


8

D_2-дофаминовых рецепторов, поможет понять логику химических модификаций, которым в ходе скрининга подвергали исходную природную молекулу пептидного алкалоида эрготоксиновой группы **1**. Эта работа все еще не завершена, продолжают появляться как патенты, так и новые предложения на рынке фармацевтической продукции. Однако на сегодня главным представителем этой группы лекарственных препаратов остается 2-бром-α-эргокриптин. Этот полусинтетический алкалоид из спорыньи является типичным фитохимическим препаратом, производство которого связано с выращиванием сырья растительного происхождения.

Технология выпуска этих препаратов сложна и имеет комплексный характер. Здесь переплетаются разные проблемы, касающиеся селекции штаммов и агротехнологии возделывания озимой ржи, на которой растет паразитарный штамм спорыньи, затем заготовки, сушки, хранения, и, наконец, переработки рожков путем экстракции и фракционирования с последующей химической модификацией полученного продукта в целевые субстанции. Сложность и взаимосвязанность всех этих комплексных факторов и технологий требует решения химических задач анализа: субстанций, промежуточных продуктов, сырья и выбора наиболее оптимальных технологических режимов при работе с лабильными соединениями пептидного строения.

Собранные со ржи, вызревшие и высушенные склероции (рожки) культивируемой спорыньи используются в качестве лекарственного сырья. Склероции содержат алкалоиды индольного ряда, высшие жирные кислоты, амины, аминокислоты, пигменты. Спорынья, культивируемая на ржи, продуцирует в основном



Пептидные эргоалкалоиды

Группа R_2	Эрготаминовая группа $R_1 = -CH_3$	Эрготоксиновая группа $R_1 = -CH(CH_3)_2$
$-CH_2C_6H_6$	эрготамин (8*R*) эрготаминин (8*S*)	эргокристин (8*R*) эргокристинин (8*S*)
$-CH(CH_3)_2$	эрговалин (8*R*) эрговалинин (8*S*)	эргокорнин (8*R*) эргокорнинин (8*S*)
$-CH_2CH(CH_3)_2$	α-эргозин (8*R*) α-эргозинин (8*S*)	α-эргокриптин (8*R*) α-эргокриптинин (8*S*)
$-CH(CH_3)CH_2CH_3$	β-эргозин (8*R*) β-эргозинин (8*S*)	β-эргокриптин (8*R*) β-эргокриптинин (8*S*)

Схема 1

алкалоиды, относящиеся к производным лизергиновой (изолизергиновой) кислоты — так называемые классические эргоалкалоиды [9]. Известны 20 пар алкалоидов — пептидов лизергиновой кислоты, являющихся диастереоизомерами по положению $C_{(8)}$. Каждая пара состоит из физиологически активного левовращающего алкалоида и его правовращающего малоактивного эпимера. Биосинтез этих соединений подвержен значительным изменениям в зависимости от наследственных свойств штаммов гриба и условий культивирования. Путем селекции выведены высокопродуктивные штаммы спорыньи. На схеме 1 приведены данные о строении молекул выделяемых из спорыньи эргоалкалоидов 2-х групп (эрготаминовой и эрготоксиновой). Существуют еще несколько семейств эргоалкалоидов, встречающихся реже и в меньших количествах.

Так называемая пептидная часть этих эргоалкалоидов, связанная N-концом пептида с лизергиновой частью молекулы, представлена фрагментами, имеющими в своей основе трипептиды следующих последовательностей:

Ala-Phe-Pro	Val-Phe-Pro
Ala-Val-Pro	Val-Val-Pro
Ala-Leu-Pro	Val-Leu-Pro
Ala-Ile-Pro	Val-Ile-Pro

Можно представить эту часть структуры как результат сворачивания и циклизации трипептидной цепи с образованием ряда дополнительных ковалентных связей, за счет чего возникает специфическая оксазоло-пирроло-пиразиновая трициклическая конструкция. Она характеризуется тем, что такое сворачивание жестко закрепляет *цис*-конформацию X—Pro-связи и позволяет молекуле избирательно взаимодействовать с рецепторами центральной нервной системы [10]. Если учесть еще специфический вклад лизергиновой части молекулы, биогенез которой из триптофана и мевалоновой кислоты хорошо изучен [11], то структурно-функциональная уникальность этих природных молекул становится очевидной.

Строение и стереохимия эргопептидных алкалоидов хорошо изучены. Их полный химический синтез осуществлен в 1950—60-х гг. группами исследователей с участием таких выдающихся синтетиков как Вудворд, Корнфельд, Хофманн [12]. Однако полный синтез так и не стал основным методом их получения, за исключением некоторых неприродных производных [13] — препаратов ценных для медицины. Как и ранее, сырьевую базу для обеспечения промышленных производств создает выращивание гриба семейства спорыньевых — спорыньи пурпуровой.

Продуктивность склероциев спорыньи в биотехнологической системе «гриб—растение»

Спорынья пурпуровая — *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul., семейство Спорыньевые — *Clavicipitaceae*, класс сумчатые грибы — *Ascomycetes*.

Известно 9 видов спорыньи, паразитирующих на злаках: ржи, ячмене, пшенице, овсе, пырее, овсянице, еже, тимофеевке, костре и др. Наиболее часто встречается спорынья пурпуровая, которая поражает преимущественно рожь. Этот гриб имеет сложный цикл развития (см. рис. 1), состоящий из трех стадий: склероидиальной, сумчатой и конидиальной. При спонтанном развитии спорыньи во время цветения ржи аскоспоры гриба попадают на рыльца пестиков цветков злака и прорастают. Мицелий гриба про-

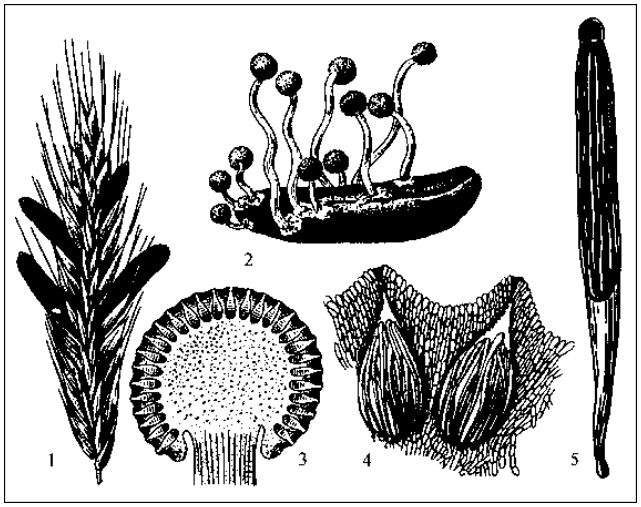


Рис. 1. Спорынья *Claviceps purpurea* Tulasne:

1 — колос ржи со склероциями, 2 — стромы на перезимовавшем склероции, 3 — продольный разрез через строму, 4 — продольный разрез перитеции с сумками, 5 — сумка с нитевидными аскоспорами

никает в завязь и разрастается в ней. На концах гиф отшнуровывается много бесцветных одноклеточных конидий, которые выделяются на колосе в виде капель сахаристой жидкости — «медвяной росы». Появление «медвянной росы» происходит спустя 7—14 суток после заражения цветка спорами гриба. Различные насекомые, питаясь «медвяной росой», а также ветер или капли дождя переносят конидиоспоры на другие цветки и заражают их (вторичное заражение растений). После прекращения спороношения мицелиальные сплетения гриба в завязи ржи уплотняются, разрастаются и превращаются в удлиненно-продолговатые, слегка искривленные темно-фиолетовые твердые сплетения грибницы-склероции, имеющие форму рожка. Это покоящаяся, зимующая форма гриба. Склероции усилено растут до созревания зерна. Их длина достигает 10—60 мм, толщина до 7 мм. Сухая масса одного рожка может достигать 1,7 г. Рожки обычно крупнее зерен ржи, но меньшей удельной массы. Склероции спорыньи, вырастающие на других злаках, особенно на многолетних травах, могут иметь другую форму и размеры, соответственно особенностям строения цветков их хозяев. В естественных условиях созревшие склероции осыпаются на поверхность почвы и зимуют. Весной они прорастают, образуя красновато-фиолетовые плодовые тела (стромы), состоящие из ножки и головки. В головках развивается большое количество плодовых тел (перитециев), имеющих вид овальных полостей с узкими отверстиями на вершине. В перитециях образуется масса сумок (асков). Каждая сумка содержит по 8 нитевидных аскоспор. Созревшие аскоспоры выбрасываются из отверстия перитеция и разносятся ветром, попадают на рыльца цветков ржи или других злаков, где они прорастают, повторяя описанный выше цикл развития гриба.

Аскоспоровое (генеративное) размножение гриба используется только при селекции некоторых высокожизнеспособных штаммов спорыньи. Технология культивирования спорыньи на ржи связана с конидиальной (вегетативное размножение гриба) и склероидальной стадиями. Искусственное первичное инфицирование растений производится конидиоспорами, культивируемыми в сапрофитных условиях на питательных средах, а склероции служат сырьем для получения препаратов, используемых в медицине.

В настоящее время согласно литературным данным промышленное получение эргоалкалоидов в Европе основано на глубинном культивировании различных штаммов *Claviceps* [14—18]. Из опубликованных работ следует, что биотехнологический путь имеет ряд преимуществ перед получением алкалоидов спорыньи на основе паразитарных форм *Claviceps*. Это — возможность получения стандартного сырья независимо от времени года и погодных условий, создание экологически чистого безотходного производства, целенаправленное регулирование биосинтеза и др. Ряд зарубежных фирм располагают высокопродуктивными штаммами спорыньи, осуществляют производство эргоалкалоидов при глубинном культивировании и импортируют готовые субстанции. Однако конкретные технологические аспекты процесса остаются тщательно охраняемыми секретами фирм. Тем не менее, ряд стран Европы и Америки (Франция, Чехия, Югославия, Польша, Аргентина, Венгрия) продолжают совершенствовать выращивание паразитарных форм гриба в полевых условиях [19]. В лекарственном растениеводстве культура спорыньи на ржи является примером осуществления целенаправленного биотехнологического продукционного процесса с использованием двух биологических систем: растения и культуры гриба [20]. Недостаток этой технологии состоит в сезонности выращивания спорыньи и в нерегулируемости воздействия некоторых факторов среды на ее урожайность. Технология возделывания спорыньи на ржи обладает значительными резервами повышения биопродуктивности этой ценной лекарственной культуры. Для реализации этих резервов предусматривались два направления исследований, которые осуществлялись в ВИЛАРе параллельно в течение многих лет: усовершенствование селекционного процесса с целью создания новых высокоалкалоидных штаммов спорыньи (эндогенная регуляция биопродуктивности) и на их основе научное обоснование, разработка и усовершенствование приемов повышения урожайности склероциев спорыньи (экзогенная регуляция биопродуктивности). Конечная цель этих исследований состояла в создании сырьевой базы для разработки и освоения производства отечественных препаратов на основе эргоалкалоидов [21].

В настоящее время в России ВИЛАР — единственная научная организация, выполняющая весь комплекс исследований в области эргоалкалоидов — от селекции штаммов-продуцентов и поиска научных основ регуляции урожайности склероциев спорыньи в биотехнологической системе «гриб—растение» до разработки лекарственных средств, технологии получения, стандартизации и метрологии препаратов из эргоалкалоидов и их промышленного производства.

Селекция и воспроизводство штаммов-продуцентов эргоалкалоидов

До 1958 г. потребность фармацевтической промышленности России в спорынье удовлетворялась за счет сбора склероциев со ржи при ее возделывании на зерно. В дальнейшем запасы дикорастущей спорыньи резко уменьшились благодаря улучшению селекции и агротехники возделывания зерновых культур. Заготовка спорыньи таким способом утратила практическое значение. В связи с этим спорынья была введена в культуру и выращивается в специализированных хозяйствах.

Учитывая разнокачественность химического состава алкалоидов в склероциях спорыньи, ВИЛАР создает селекционные штаммы с преобладающим содержанием различных целевых эргоалкалоидов: эрготаминовые, эргокриптиновые, эргокристиновые, эргометриновые. Селекция штаммов производится в основном по двум хозяйственно ценным признакам: урожайности склероциев и содержанию в них алкалоидов. Отобранные по морфологическим показателям склероции спорыньи разделяются на половинки. В одной из них количественно определяют содержание суммы алкалоидов и их качественный состав [22—24]. Из оставшихся после проведения химических анализов отобранных лучших половинок суперэлитных склероциев выращивают чистые культуры гриба — линии. Лучшие суперэлитные линии размножают в сапрофитных ус-

ловиях на питательных средах. Выращенным элитным инфекционным материалом производят искусственное инфицирование (заражение) растений озимой ржи на производственных плантациях и на делянах в поле, где оценивают штаммы – продуценты по урожайности склероциев.

Результаты таких исследований свидетельствуют, что наивысшая продуктивность спорыньи может быть достигнута, когда инфекционный материал штаммов формируется не менее чем из 2—3 суперэлитных линий, выращиваемых в сапрофитной культуре раздельно и объединяемых непосредственно при приготовлении водной суспензии конидиоспор для инфицирования растений. Необходимо проводить отбор суперэлитных склероциев с содержанием в них суммы алкалоидов 0,7—1,2% с интервалом этого показателя в исходном селекционном материале от 0,4 до 1,75%. При отборе таких суперэлит достигается наиболее благоприятное сочетание основных показателей биопродуктивности спорыньи: урожайности рожков и содержания в них алкалоидов.

Наряду с усовершенствованным традиционным методом индивидуального отбора склероциев по урожайности потомства, а также по количественному компонентному составу эргоалкалоидов, в селекции паразитарной спорыньи с успехом используется и генеративная стадия развития гриба. Получение из аскоспор генетически обогащенного материала с преимущественным содержанием целевых эргоалкалоидов используют периодически для повышения жизнеспособности селекционных штаммов спорыньи.

Для повышения эффективности селекционных работ культурной спорыньи необходимы быстрые и надежные методы определения качественного состава и количества эргоалкалоидов в микронавесках сырья. Для воспроизводства и селекции штаммов ежегодно проводят анализ более 1000 склероциев, из которых отбирают наиболее перспективные. Первоначально определяется содержание суммы эргоалкалоидов в склероции, для чего используется фотоколориметрический экспресс-метод анализа с применением реактива Ван-Урка. После первого этапа отбора склероциев спорыньи по количественному содержанию, проводится определение качественного состава отдельных алкалоидов. Для этой цели применяются разработанные нами хроматофлуориметрический и хроматоденситометрический экспресс-методы, включающие тонкослойную хроматографию (ТСХ) с последующим сканированием хроматограмм путем измерения интенсивности флуоресценции или оптической плотности пятен [23]. Эти методы широко апробированы на селекционных образцах спорыньи. Их чувствительность в 100 раз выше чувствительности колориметрического метода, применявшегося ранее.

Благодаря исключению стадий обезжиривания спорыньи и элюирования эргоалкалоидов с хроматографических пластинок, а также высокой чувствительности и точности флуориметрического метода анализ обеспечивает количественное определение эргоалкалоидов в минимальных навесках, что особенно важно для проведения селекционных и физиолого-биохимических исследований. Детальное исследование алкалоидного состава новых и экспериментальных линий штаммов спорыньи, требующее установления структуры и идентификации эргоалкалоидов, проводится с применением метода ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопии и двумерного электрофореза [24, 25].

Чистые культуры гриба-линии и полученный из них суперэлитный материал выращивают в пробирках на косяках с использованием в качестве питательной среды неохмеленного пивного сусла с агар-агаром или синтетической агаризованной среды. Элитный инфекционный материал выращивают в колбах-матрацах на зерне озимой ржи. Разрабатывается способ глубинного культивирования инфекционного материала (конидиоспор) в ферментерах объемом до 200 л.

Генофонд паразитирующей культуры спорыньи включает 15 селекционных отечественных и зарубежных штаммов — продуцентов эргокриптина, эргокристина, эрготоксина, эрготамина, эргометрина и эргокорнина. Ежегодно проводятся лабораторные и полевые испытания перспективных селекционных номеров и воспроизводство этих коллекционных штаммов в виде склероциев гриба, которые могут сохраняться в жизнеспособном состоянии в течение двух лет. Совместно с сотрудниками Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) разработаны современные способы длительного сохранения генофонда спорыньи, к которым относится лиофилизация и криогенная консервация конидиоспор гриба [26].

Путем селекции получены отечественные высокопродуктивные штаммы паразитарной спорыньи, продуцирующие каждый в основном один из алкалоидов. Использование таких штаммов в производстве лекарственных препаратов позволяет значительно упростить технологию, снизить расходные коэффициенты сырья и дорогостоящих материалов. Для производства выведены высокопродуктивные промышленные штаммы спорыньи эрготаминового и эрготоксинового типов. По показателям урожайности, содержания и чистоты спектра эргоалкалоидов эти селекционные штаммы соответствуют уровню лучших зарубежных, а по некоторым показателям и превосходят последние. Проведен большой объем селекционных работ по получению нового для нашей страны высокопродуктивного эргокриптинового штамма спорыньи. В результате селектированы отечественные штаммы, в склероциях которых содержание целевых алкалоидов (α- и β-эргокриптинов) находится в соотношении близком к 1:1 и достигает 0,7—0,9% [27]. Эти штаммы по продуктивности превосходят аналогичные зарубежные и послужили основой создания отечественной сырьевой базы для разработки и освоения производства нового лекарственного препарата Абергин для лечения нейрогормональных расстройств. Химико-технологические, медикобиологические и фармакологические исследования подразделений ВИЛАР, а также клинические испытания Абергина были полностью обеспечены сырьем созданных штаммов. В течение нескольких последних лет такое сырье используется в промышленном производстве этого препарата, имеющего преимущества перед зарубежным аналогом — Парлоделом.

Методом индивидуального отбора из склероциев дикорастущей спорыньи был селектирован штамм с повышенной продуктивностью одного из биологически активных алкалоидов — эргокристина. В Россий-

ской Федерации до настоящего времени промышленного штамма эргокристиновой спорыньи не существовало. Основным достоинством полученного штамма является высокое содержание целевого вещества — эргокристина в сырье (0,5—0,6%), а также подавляющее преобладание этого соединения в сумме эргоалкалоидов [28]. На основе штамма разработан новый отечественный препарат Новокристин (дигидроэргокристина мезилат) для лечения нарушений периферического кровообращения и мигреней. В настоящее время организовано его промышленное производство.

Нами был выделен оригинальный штамм спорыньи – продуцент эргокорнама, в котором в результате мутационного процесса закреплен биосинтез эргоалкалоида лактамного ряда, как основного продукта [29]. Новый селекционный штамм спорыньи [30] не имеет прототипов и накапливает 0,5—0,8% суммы алкалоидов, в составе которой содержится 0,2—0,4% эргокорнама и около 0,2—0,3% составляет продукт распада эргокорнама — валинамид, а также в минорных количествах присутствует эргометрин. Данную группу алкалоидов можно считать перспективной для использования в медицине. Наличие в коллекции штаммов источников эргокристина, изомеров эргокриптина и эргокорнина, в перспективе позволяет на основе полусинтетических производных эргоалкалоидов создать серию новых лекарственных препаратов.

Выращивание на ржи разных штаммов спорыньи, отличающихся по качественному составу алкалоидов, осуществляется в условиях строгой пространственной изоляции [21, 31—33]. Ежегодно проводятся работы по воспроизводству селекционных штаммов и по масштабированию культивирования в сапрофитных условиях суперэлитного и элитного инфекционного материала гриба. Этим материалом инфицируют посевы озимой ржи для товарного производства склероциев спорыньи. Производственные штаммы-продуценты эргоалкалоидов депонируются и хранятся в ВКПМ в виде криогенно законсервированных конидиоспор гриба.

Результативность возделывания спорыньи на стерилизованных гаметоцидами растениях ржи

Во взаимодействии гриба спорыньи и растений ржи большое значение имеют особенности мужского и женского гаметофита растения-хозяина. До недавнего времени производство склероциев спорыньи базировалось на использовании диплоидных и тетраплоидных сортов и сортообразцов фертильной ржи зернового типа. В период массового выделения конидиоспор на рыльцах пестиков растения-хозяина могут прорастать как споры, так и пыльцевые зерна ржи. В первом случае в цветках развиваются склероции гриба, а во втором — зерновки ржи. Такая своеобразная конкуренция конидиоспор гриба и фертильной пыльцы растения зависит от длительности открытого цветения ржи и от жизнеспособности ее пыльцы. Учитывая, что эти показатели поддаются экзогенной регуляции, в течение нескольких лет нами были проведены опыты по индуцированию свойства стерильности ржи гаметоцидами, так как известно, что пыльца стерильной ржи не прорастает на рыльце пестика и не способна оплодотворить завязь цветков.

В результате проведенного в полевых условиях скрининга 28 синтетических химических соединений были выделены семь, которые обладали гаметоцидной активностью в диапазоне 1,0—2,5% концентраций и индуцировали мужскую стерильность растений ржи. Совместное применение одного из этих гаметоцидов с другим изученным химическим соединением в концентрации 0,15—0,20% приводило к синергическому эффекту индуцирования облигатной (мужской и женской) стерильности цветков, достигающей 100%. Были определены оптимальные способы инфицирования стерильных растений, параметры рационального использования инфекционного материала, а также наиболее чувствительные периоды к действию гаметоцидов, когда идет образование зачаточного соцветия и дифференциация зачаточных цветков. Такое состояние растений соответствует фазе начального стеблевания (выхода в трубку) ржи. Доказано что химически индуцированную стерильность растений можно создавать у любых сортов ржи, но в наибольшей степени на гаметоциды реагируют тетраплоидные сорта озимой ржи. Спектр эргоалкалоидов и их содержание в склероциях не изменялись под влиянием воздействия на растения гаметоцидов.

Была изучена биология цветения озимой ржи с химически индуцированной мужской и облигатной стерильностью. На основе исследования физиолого-биохимических особенностей взаимодействия растения-хозяина и гриба-паразита, получения индуцированной гаметоцидами облигатной стерильности растений ржи [34—36], а также использования новых селекционных штаммов была разработана и широко апробирована в производственных условиях интенсивная технология производства склероциев спорыньи, в результате чего была достигнута наибольшая продуктивность этой лекарственной культуры (табл. 1).

Использование стерильной ржи обеспечивает получение биологического урожая склероциев спорыньи до 1500 кг/га. Фактическая хозяйственная урожайность с учетом производственных потерь при уборке и послеуборочной обработке сырья достигала 725 кг/га, что в 6—7 раз превышает урожайность склероциев при

Таблица 1

Результаты применения гаметоцидов при выращивании спорыньи

Вариант испытания	Масса сухих склероциев, кг/га	Содержание эргоалкалоидов, % сухого вещества		
		сумма	α+β-эргокриптин	эрготамин
Эргокриптиновый селекционный штамм				
Стерильная рожь	1490	0,72	0,57	—
Фертильная рожь	502	0,78	0,61	—
Эрготаминовый селекционный штамм				
Стерильная рожь	790	0,58	—	0,43
Фертильная рожь	280	0,58	—	0,43

применяемой ранее технологии возделывания спорыньи на фертильной ржи. Такая технология позволяет резко повысить эффективность производства склероциев спорыньи и обеспечить этим сырьем выпуск лекарственных препаратов на основе эргоалкалоидов.

В настоящее время в результате проведенного цикла исследований по химическому индуцированию у озимой ржи нового типа облигатной (мужской и женской) стерильности цветков появилась возможность усовершенствования такого ключевого элемента технологии возделывания спорыньи на ржи как инфицирование растений конидиоспорами гриба. В итоге проведения лабораторных, вегетационных, полевых опытов и производственных испытаний показана высокая результативность инфицирования стерилизованной гаметоцидами озимой ржи спорыньей путем опрыскивания цветущих колосьев инфекционным материалом, оптимизированным по составу компонентов питательной среды с учетом их физиологических и физических свойств, а также экономических показателей [36].

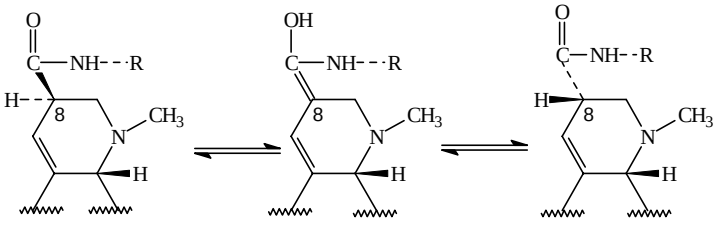


Схема 2

Переработка селекционных эрготоксиновых штаммов *Claviceps purpurea* при производстве лекарственных средств

Создание отечественных высокопродуктивных штаммов спорыньи с хорошей способностью к образованию жизнеспособных конидиоспор, которые при паразитарной культуре на ржи дают повышенный выход эрготоксиновых алкалоидов (схема 1), позволяет значительно упростить технологию очистки алкалоидов и снизить расходные коэффициенты по сырью и материалам по сравнению с ранее известными методиками, а также обеспечить доступным сырьем производство.

Переработка сырья проводится по общей для всех препаратов схеме. В этой части работы усилия были направлены на совершенствование выделения суммы алкалоидов эрготоксиновой группы на стадии экстракции из сырья [37—41]. Существуют два принципиально возможных подхода, отличающиеся по эффективности в зависимости от продуктивности штаммов *Cl. purpurea*: 1) экстракция неполярными растворителями (дихлорэтан, хлороформ, толуол) при pH 8—9; 2) экстракция алкалоидов в полярных кислых средах при pH 2—3 органическими растворителями, смешивающимися с водой (спирты, ацетон). Так, экстракция дихлорэтаном в присутствии водного аммиака наиболее выгодна, если содержание алкалоидов в склероциях достигает 0,5—0,7% и выше. Напротив, извлечение суммы алкалоидов 50% водным ацетоном при подкислении серной кислотой наиболее приемлемо при содержании алкалоидов в сырье 0,2—0,4%. Большое влияние на выбор технологического процесса оказывают также наличие в сырье эпимерных физиологически неактивных алкалоидов и образование их в ходе переработки. Их отношение к целевым веществам колеблется в зависимости от условий сушки, хранения и переработки рожков от 10 : 90 до 35 : 65.

Алкалоиды эрготоксиновой группы (8*R*-изомеры) обладают повышенной склонностью к эпимеризации при $C_{(8)}$ с образованием эпимеров 8*S*-конфигурации [9]. В растворе алкалоид и эпимер являются равновесными формами (см. схему 2), но в щелочной среде или при нагревании равновесие смещается в сторону эпимера. Известный прием обратной равновесной эпимеризации путем получения малорастворимых фосфорнокислых солей целевых алкалоидов (их эпимеры таких солей не образуют) отчасти позволяет справится с этой проблемой. Фосфат эргоалкалоидов выпадает в осадок, при этом равновесие системы алкалоид—эпимер сдвигается в сторону образования целевого алкалоида [42].

Другие особенности переработки рожков спорыньи связаны с тем, что алкалоиды, получаемые из них, неустойчивы на свету, распадаются при нагревании и чувствительны к pH и кислороду воздуха; это накладывает жесткие ограничения при выборе годовых мощностей и объемов единичных загрузок при переработке сырья. Оптимизация по времени технологических операций, особенно связанных с нагреванием или нахождением в тонком слое под действием света, с хранением растворов, с упариванием в пленочных испарителях, сушкой, измельчением и просеиванием порошков, является одной из ключевых задач промышленного производства лекарственных субстанций из этого типа сырья. Основное требование к промышленным приемам очистки эргоалкалоидов — эффективность и быстрота проведения процессов — приводит к выбору «флеш» техники хроматографии (фильтрация через слой сорбента под вакуумом) [38—43]. После упаривания фракций хроматографической очистки, содержащих алкалоиды, остаток кристаллизуют из подходящего растворителя. На стадии кристаллизации с успехом используют способность эргоалкалоидов природной 8-*R* конфигурации образовывать сольваты с тем растворителем, из которого они кристаллизуются. С целью уменьшения потерь алкалоидов маточные растворы от кристаллизации и первые фракции хроматографической очистки, содержащие эпимер, подвергают обратной эпимеризации [44].

Для оценки результатов очистки выделяемых из рожков алкалоидов эрготоксиновой группы применяют методы: ТСХ, ВЭЖХ и ЯМР-спектроскопию [45—48]. Так, состав смесей эргоалкалоидов одинаково хорошо диагностируется и ^{1}H ЯМР и ВЭЖХ, позволяя оценить примеси родственных алкалоидов (рис. 2, 3). При постадийном контроле оба метода позволяют оценивать соотношение изомеров α- и β-эргокриптинов, а также состав сольвата, поскольку не всегда методом определения процента летучих веществ можно получить точный результат, так как сольваты некоторых эргоалкалоидов не удается разрушить при нагревании в вакууме полностью.

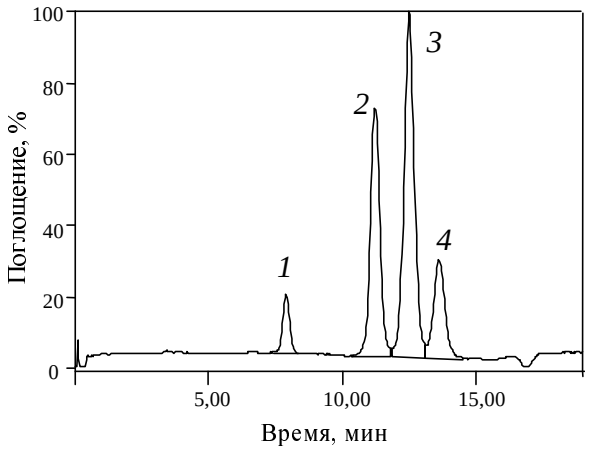


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ алкалоидов эрготоксиновой группы:
1 — эргокорнин, *2* — α-эргокриптин, *3* — β-эргокриптин, *4* — эргокристин

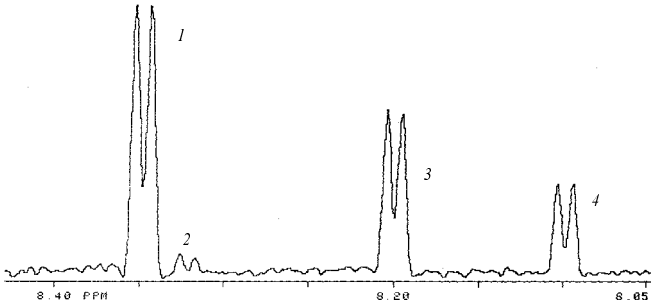


Рис. 3. Фрагмент ^{1}H ЯМР-спектра алкалоидов эрготоксиновой группы:

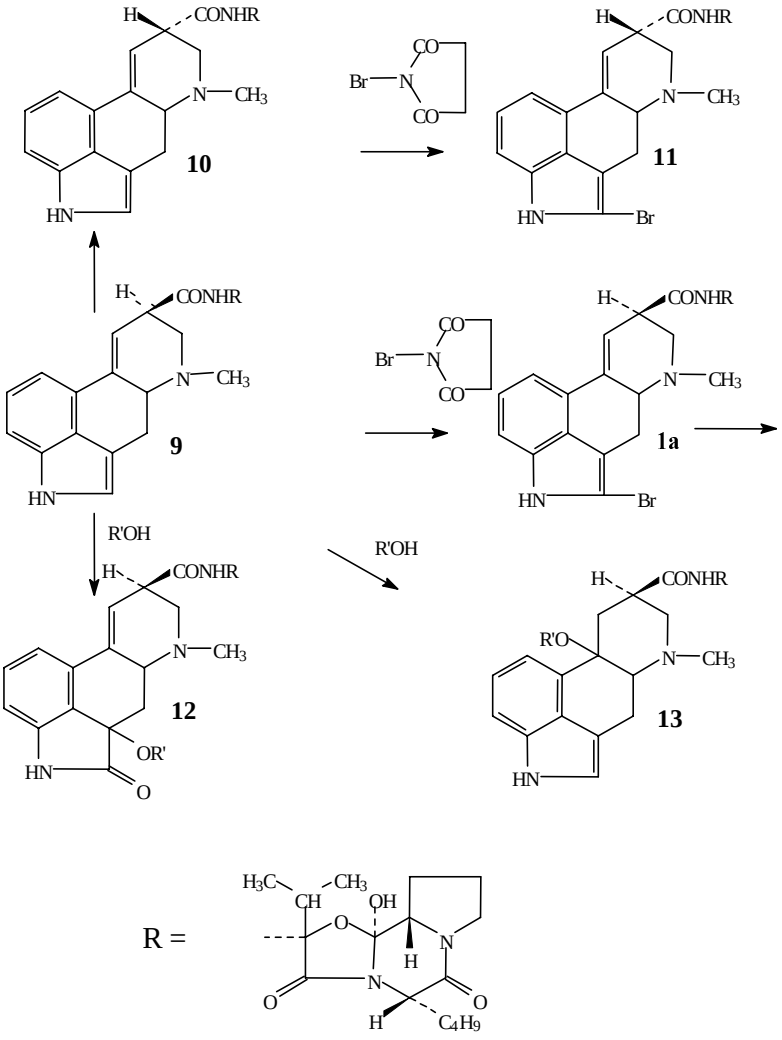
Дублетные сигналы циклольной ОН-группы: *1* — β-эргокриптина, *2* — эргокорнина, *3* — α-эргокриптина, *4* — эргокристина

Модификация эрготоксиновых алкалоидов бромированием

Реакция бромирования эргоалкалоидов по положению 2 индольного кольца действием N-бромсукцинимида протекает неоднозначно в связи с высокой химической лабильностью молекул этих природных соединений и сопровождается рядом побочных превращений (см. схему 3) [49—51].

Обычно в ходе растворения, в процессе проведения реакции и очистки целевого продукта происходит эпимеризация в положении $C_{(8)}$ молекул алкалоидов с образованием α,β-эргокриптининов **10** и 2-бром-α,β-эргокриптининов **11**. Чтобы ускорить реакцию бромирования и избежать образования эпимеров **10**, **11**, применяют избыток N-бромсукцинимида (1,5 моль на моль алкалоидов). В противном случае часть исходного основания **9** не прореагирует и затруднит очистку целевого вещества **1a**. Большие избытки бромирующего агента не желательны, так как вызывают образование полибромпроизводных. В реакционной массе не должны присутствовать вода и спирты, т.к. это ведет к образованию интенсивно окрашенных примесей в результате фотоприсоединения по двойной связи $C_{(9)}$—$C_{(10)}$ (соединение **13**), к тому же происходит окисление по $C_{(2)}$ положению индольного кольца с образованием соединения **12** [51]. С учетом этих факторов главным условием успешной технологии становится быстрое и направленное проведение реакции бромирования при минимуме побочных превращений.

Бромирование является реакцией радикального типа и в связи с этим требует наличия в реакционной среде инициаторов, таких как гидроперекиси. Этим



R =

Схема 3. Бромирование эрготоксиновых алкалоидов

Таблица 2

Характеристика препаратов нейрогормональных средств на основе бромкриптина [61]

Название препарата	Фирма производитель, страна	Лекарственная форма, дозировка
Парлодел	«Novartis Pharma», Швейцария	Таблетки, 2,5 мг
Бромэргон	«Lek», Словения	Таблетки, 2,5 мг, 10 мг
Бромкриптин	«Gedeon Richter», Венгрия	Таблетки, 2,5 мг
Абергин	ВИЛАР, Россия	Таблетки, 4,0 мг
Серокриптин	«Serono», Италия	Таблетки, 2,5 мг
Бромокриптин-поли	CSC, Италия	Таблетки, 2,5 мг, Капсулы 5 мг, 10 мг

обусловлена необходимость присутствия в реакционной среде диоксана, содержащего определенное количество гидроперекисей. Считается, что концентрация гидроперекисей порядка 0,01% достаточна для проведения реакции.

Первые публикации по поводу бромирования эрготоксинов N-бромсукцинимидом появились в 1957 г. [52]. Бромирование проводили в среде диоксана при нагревании, выход **1** составлял всего 38% [53]. В течение ряда лет были предложены другие реагенты, такие как N-бромкапролактам [52], N-бромфталимид [52], N-бромсахарин [52], триметилбромсилан в диметилсульфоксиде [54], дибромид 3-бром-6-хлор-2-метилимидазопиридазин [55], пирролидинон-2-гидротрибромид [49], пиперидин-2-гидротрибромид [49], бром в присутствии эфирата BF_3 [51]. Слишком высокая реакционная способность предложенных соединений или необходимость специально готовить бромирующее средство непосредственно перед реакцией, а также легкое образование побочных веществ — все это послужило причиной того, что усилия исследователей продолжали быть направленными на оптимизацию реакции с использованием N-бромсукцинимида [50, 56–58].

Так, чешские авторы [57] предложили проводить бромирование α-эргокриптина N-бромсукцинимидом в смеси диоксан—хлористый метилен 1 : 10 ÷ 1 : 5. При этом было замечено, что, если поддерживать количество перекисей в диоксане в пределах 0,1—0,5%, то реакция проходит с высоким выходом и без нагревания за 1—2 часа. Еще удобнее оказалось вести бромирование в смеси диоксан—хлороформ при содержании перекисей в диоксане около 0,2% [58]. В этом случае реакция заканчивается за 20—30 мин без образования значительных количеств примесей.

Однако полностью избежать образования эпимера при $C_{(8)}$ **11** не удается и в этих мягких условиях. Более того, в процессе очистки продукта реакции бромирования количество эпимера **11** возрастает.

Упомянутая выше способность $C_{(8)}$-*S*-эпимеров эрготоксиновых алкалоидов к равновесному переходу в $C_{(8)}$-*R*-соединения помогает справиться с этой проблемой (см. выше), так как смесь 2-бромпроизводных α- и β-эргокриптинов [59] ведет себя вполне традиционно с этой точки зрения.

Были найдены условия, в которых фосфаты 2-бромалкалоидов природной конфигурации кристаллизуются и выпадают в осадок, а эпимеры по $C_{(8)}$ (2-бром-α,β-эргокриптинины) остаются в растворе, постепенно переходя в соответствии с равновесием двух эпимеров с разной конфигурацией при $C_{(8)}$ снова в природные изомеры, которые затем выпадают в осадок в виде фосфата [54, 59]. Препаративная ценность этого приема довольно высока, если учесть, что дополнительное количество вещества природной конфигурации (около 20%) может быть возвращено в процесс, вместо того чтобы быть отброшенным в виде некристаллизующихся маточников и головных фракций хроматографической очистки.

Важность разработки путей получения нейрогормональных препаратов эргопептидного ряда связана с тем, что они занимают одно из центральных мест среди препаратов, включенных в раздел XIV «Гормоны и средства, влияющие на эндокринную систему» в перечне жизненно необходимых и важнейших лекарственных веществ, утвержденном распоряжением правительства РФ за 2004 г. Этими лекарствами должны быть обеспечены все государственные аптеки, больницы и станции «скорой помощи» [60].

В настоящее время реестр лекарственных средств России [61] включает ряд препаратов, действующим началом которых является бромкриптин (см. табл. 2). Наряду с ними американской фирмой «Pharmacia» предложен препарат Достинекс, действующим веществом которого является каберголина фосфат (таблетки по 0,5 мг) [62]. Это представитель полусинтетических производных лизергиновой кислоты, он отличается пролонгированным действием и меньшими дозировками при применении [2].

Создание и осуществление описанной в данном обзоре группы технологий, включающих селекцию штаммов и выращивание клеточных культур, сохранение и очистку лабильных природных соединений алкалоидов и их химическую модификацию, было бы невозможно без научной кооперации специалистов разного профиля и внедрения современных чувствительных и селективных методов контроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cassady G.M., Floss H.G.* Lloydia, 1977, v. 40, № 1, p. 90—106.
2. Нейроэндокринология. Под ред. Е.И. Маровой. Ярославль: «Диа-пресс», 1999, 506 с.
3. *Трумпе Т.Е., Колхир О.К., Омельницкий П.П. и др.* Тр. ВИЛАР, Химия, технология, медицина, М., 2000, с. 200—209.
4. *Giudici D., Zaccheo T.* Drugs of the Future, 1987, v. 12, № 9, p. 842—844.

5. *Van Dam L.G., Rolland R.* En. J. Obstet. Reprod. Biol., 1981, v. 12, p. 323.
6. Drugs of the future, 1989, v. 14, № 4, p. 397.
7. *Pfaetfli P.* Patent CH № 652719, 1985.
8. Sandoz AG, Annual Drug Data Report, 1989, XI, № 6, p. 452.
9. *Комарова Е.Л., Толкачёв О.Н.* Хим.-фармацевт. ж., 2001, т. 35, № 9, с. 37—45.
10. *Yaron A., Naider F.* Crit. Rew. of Biochem. and Molec. Biol., 1993, v. 28, № 1, p. 31—81.
11. *Floss H.G.* Tetrahedron, 1976, v. 32, p. 873—910.
12. *Berde S., Schield H.O.* Ergot alkaloids and related compounds, Handbuch der experimental pharmacology, N. J., 1978, p. 29—85.
13. *Troxler F., Stadler P.* US Patent № 4609657, 1986.
14. *Řeháček Z., Sajdl P.* Ergot alkaloids Chemistry, Biological Effects, Biotechnology, ČSAV, Praha, 1990, 487 p.
15. *Ржехачек З.* Изв. АН СССР, Сер. биол., 1976, № 2, с. 208—220.
16. *Саркисова М.А., Шалагина А.И., Баньковская А.Н.* Микология и фитопатология, 1979, т.13, вып.6, с. 479—484.
17. *Козловский А. Г., Соловьва Т. Ф., Слоска Л., Григоров И.* Прикладная биохимия и микробиология, 1986, т. 22, вып. 4, с. 548—553.
18. *Wack G., Kiss J. e. a.* US Patent № 4369252, 1983.
19. *Ken V., Harazim P., Malinka Z.* Medical and Aromatic Plants VII. Ed. Y.P.S. Baja. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1994, p. 139—156.
20. *Шаин С.С.* Возделывание спорыньи на ржи. Обзорная информация. Сер. «Лекарственное растениеводство» М., ЦБНТИ, Минмедбиопром, 1987, вып. 4, 50 с.
21. *Шаин С.С.* Прикладная биохимия и микробиология, 1996, т. 32, № 3, с. 275—279.
22. *Волошина Д.А., Монахова Т.Е., Шаин С.С.* Хим.-фармацевт. ж., 1985, № 4, с. 445—447.
23. *Комарова Е.Л., Шаин С.С.* Там же, 1998, № 8, с. 34—37.
24. *Волков С.К, Калько И.С., Пинеев С.А.* Там же, 1996, т. 30, № 2, с. 56—57.
25. *Ольшевский Е.Г., Козельцев В.Л., Шаин С.С. и др.* Биохимия, 1994, т. 59, вып. 2, с. 589—597.
26. *Фонин В.С., Сидякина Т.М., Шаин С.С. и др.* Прикладная биохимия и микробиология, 1996, т. 32, № 4, с. 406—410.
27. *Шаин С.С., Быков В.А., Комарова Е.Л., Трегубов В.М. и др.* Патент РФ № 1551731, 1994: № 2118661, 1998.
28. *Шаин С.С., Быков В.А., Комарова Е.Л., Трегубов В.М. и др.* Патент РФ № 2102470, 1998.
29. *Комарова Е.Л., Шаин С.С., Шейченко В.И.* Прикладная биохимия и микробиология, 2002, т. 38, № 6, с. 658—663.
30. *Комарова Е.Л., Шаин С.С. и др.* Патент РФ № 2188231, 2002.
31. *Шаин С.С., Кузнецова Г.К., Трегубов В.М. и др.* Физиология растений, 1996, т. 43, № 5, с. 692—700.
32. *Kybal J., Kleinerova E., Bulant V.* Folia Microbiol., 1976, v. 21, p. 474—480.
33. *Kybal J., Svoboda E., Strnadova K., Kejzlar M.* Ibid., 1981, v. 26, p. 112—119.
34. *Трегубов В.М., Федин М.А., Шаин С.С., Кузнецова Т.А. и др.* Авт. свид. СССР № 1378100, № 1381742, 1987.
35. *Трегубов В.М., Федин М.А., Шаин С.С., Кузнецова Т.А. и др.* Авт. свид. СССР № 1394491, № 1394492, № 1398117, № 1399909, 1988.
36. *Шаин С.С., Быков В.А., Савина Т.А., Трегубов В.М. и др.* Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сб. научных трудов. М., 2003, вып. 7, с. 214—226; 2004, вып. 11, ч. 1, с. 185—192.
37. *Schinske H., Weinert H., Schirutschka R., Grawer W.* Patent BD № 1240871, 1967.
38. *Пронина Н.В., Бурма О.И., Горбунов В.Д., Дубова З.Д.* Патент РФ № 2058316, 1996.
39. *Быков В.А., Звонкова Е.Н., Петухов С.А.* Патент РФ № 2058150, № 2058151, № 2059638, 1996.
40. *Быков В.А., Звонкова Е.Н., Дубичев А.Г. и др.* Патент РФ № 2078084, 1997.
41. *Foeldesi J., Dancsi L. e. a.* Patent HU № 180056, 1983.
42. *Dancsi L., Gazdag M. e. a.* Patent CH № 646707, 1984.
43. *Монахова Т.Е., Ануфриева В.В., Толкачв О.Н. и др.* Авт. свид. СССР № 1325872, 1987.
44. *Schirutschka R., Wolf I., Heidenbluth K.* Patent DDR № 285357, 1990.
45. *Комарова Е.Л., Толкачв О.Н.* Хим.-фармацевт. ж., 2001, т. 35, № 10, с. 18—24.
46. *Flieger M., Sedmera P., Vocoun J., Řehaček e. a.* J. Natur. Products, 1984, v. 47, № 6, p. 970—976.
47. *Spassov S. L., Mikhova B., Dankova P.* Proc. V Int. conf. Chemistry, Biotechnol. Bioactive Natural Products. Varna, Bulgaria, FECS, 1989, v. 1, p. 351—359.
48. *Комарова Е.Л., Пинеев С.А.* Хим.-фармацевт. ж., 1995, т. 29, № 8, с. 54—55.
49. *Ručman R., Koršič J., Jurgec M.* Il Farmaco. 2-Ed., 1983, v. 38, fasc. 6, p. 406—410.
50. *Токмаков Г.П., Монахова Т.Е., Толкачв О.Н., Грандберг И.И.* Хим.-фармацевт. ж., 1991, № 6, с. 45—56.
51. *Čvak L., Stuchlik J. e. a.* Coll. czechosl. chem. comumns., 1992, p. 565—572.
52. *Troxler F., Hofmann A.* Helv. chem. acta, 1957, v. 40, p. 216—263.
53. *Schneider H. R., Stadler P. A., Stutz P. e. a.* Experientia, 1977, v. 33, p. 1412—1421.
54. *Bosch E., Megyeri G.* US Patent № 4816587, 1989.
55. *Stanovnic B., Tiler M., Jurgec M., Ruman R.* Heterocycles, 1981, v. 16, № 5, p. 741—745.
56. *Соколов С.Я., Трумпе Т.Е и др.* Патент РФ № 1801006, 1992.
57. *Kejzlarova S., Stuchlik J., Krajiček A.* Aut. osvedčeny ČSSR № 250972, 1988.
58. *Быков В.А., Звонкова Е.Н. и др.* Патент РФ № 2106148, 1998.
59. *Звонкова Е.Н., Лапа Г.Б., Глотов А.А. и др.* Хим.-фармацевт. ж., 2000, т. 34, № 9, с. 36—37.
60. Российская газета, 26 октября 2004, № 236 (3613), с. 2.
61. Энциклопедия лекарств, РЛС, 1989, вып. 6. с. 65; 2004, вып. 11, с. 168.
62. Энциклопедия лекарств, РЛС, 2003, вып. 10, с. 307, 363.