

(1^o) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **278 600 A1**

4(51) C 12 P 13/04

PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	W P C 12 P / 323 741 4	(22)	23.12.88	(44)	09.05.90
------	------------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Gartz, Jochen, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Gewinnung von Tryptophanderivaten durch Kultivierung höhere Pilze

(55) Pilze, Tryptophanderivate, Fruchtkörper, Wirkstoffe, Nährmedium, Fermentationsparameter, Aufarbeitung

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die mikrobielle Gewinnung von Tryptophanderivaten. Sie ist anwendbar zur Gewinnung von Wirkstoffen für die experimentelle Neurobiologie und Arzneimittelsynthese. Die Erfindung besteht in der Verwendung von festen Nährmedien, die aus Substraten bestehen, denen 3-(2-Dialkylamino-ethyl)-indole zur Biotransformation zugesetzt werden. Die Kultivierung unter Fruchtkörperbildung erfolgt bei 4 bis 32°C unter diffusen Licht, die Extraktion und Isolierung der Wirkstoffe nach bekannter Weise. Die erfindungsgemäße Lösung führt zu hohen Ausbeuten an den 4-substituierten Derivaten bei gleichzeitiger Unterdrückung der Biosynthese anderer Indolverbindungen.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung von Tryptophanderivaten durch Kultivierung von höheren Pilzarten der Gattung *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Stropharia*, *Inocybe*, *Conocybe* und *Pluteus*, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kultivierung auf festen Nährmedien durchgeführt wird, die 0,1 bis 2% 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-indole enthalten, und die resultierenden 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-4-hydroxyindole mittels bekannter Trenn- und Reinigungsmethoden aus den Fruchtkörpern gewonnen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Alkylgruppen Ethyl-, Propyl-, Isopropyl- und Butylreste fungieren.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Kultivierung der Fruchtkörper bei Temperaturen zwischen 4 und 32°C im diffusen Licht durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Indole vorzugsweise in Form löslicher Salze zugesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Tryptophanderivaten durch künstliche Anzucht höherer Pilze auf Nährböden, die Substanzen zur Biotransformation enthalten. Die so aus den Fruchtkörpern darstellbaren 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-4-hydroxyindole sind als Modellsubstanzen in der neurobiologischen Forschung anwendbar und lassen sich ebenfalls als Zwischenprodukt bei Arzneimittelsynthesen einsetzen.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösung

4-substituierte Tryptophanderivate kommen in natürlich vorkommenden höheren Pilzen der Gattungen *Psilocybe*, *Stropharia*, *Pluteus*, *Conocybe* und *Inocybe* bei verschiedenen Arten vor. Auch künstlich kultivierte Fruchtkörper und Mycelien dieser Pilzarten bilden die methylierten Verbindungen Psilocybin, Baeocystin und Psilocin (DE 1087321). Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß biosynthetisch keine Homologen dieser Substanzen mit verlängerter Alkylkette gebildet werden können, da sie aus den eine Methylgruppe enthaltenden Tryptophan abgeleitet sind. Ein weiteres Verfahren (*Helvelica Chim. Acta* 1959, 2073) beschreibt die synthesechemische Gewinnung der 3(-2-Dialkylaminoethyl)-4-hydroxyindole. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht in einer Vielzahl von komplizierten Syntheseschritten (bis 10 Stufen), um einen Ringschluß zur Gewinnung der 4-Hydroxyindole zu erreichen. Schlechte Ausbeuten bei einzelnen Syntheseschritten sowie der Einsatz teurer und schlecht handhabbarer metallorganischer Reagenzien sind weitere Nachteile dieses Verfahrens.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die effektive Herstellung der 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-4-hydroxyindole in hohen Ausbeuten unter Vermeidung vieler synthetischer Reaktionsstufen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch ein biotechnologisches Verfahren die 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-4-hydroxyindole bei Unterdrückung der Synthese weiterer Indolverbindungen herzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß die Kultivierung von höheren Pilzarten der Gattungen *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Stropharia*, *Inocybe*, *Conocybe* und *Pluteus* auf festen Nährmedien durchgeführt wird, die 0,1 bis 2% 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-indole enthalten, und die resultierenden 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-hydroxyindole mittels bekannter Trenn- und Reinigungsmethoden aus den Fruchtkörpern gewonnen werden.

Als Alkylgruppen der bevorzugt in Form wasserlöslicher Salze eingesetzten zu biotransformierenden Indolen fungieren Ethyl-, Propyl-, Isopropyl- und Butylreste.

Die Kultivierung der Fruchtkörper erfolgt je nach Pilzart bei 4 bis 32°C im diffusen Licht.

Die genannten Pilzarten synthetisieren in den Fruchtkörpern normalerweise die Alkaloide Psilocin, Psilocybin und Baeocystin. Durch den Zusatz der 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-indole wird die *denovo*-Synthese dieser Alkaloide unterdrückt und eine Biotransformation der zugegebenen Indole im Sinne einer spezifischen Hydroxylierung in der 4-Position des Indolrings erreicht. Damit sind Ausbeuten an 4-Hydroxylierungsprodukten möglich, die 2 bis 4% der Trockenmasse der Pilze betragen.

Es wird so verfahren, daß mit einer Suspension von Mycelflocken der autoklavierte Nährboden beimpft und in geeigneten Gefäßen bei einer Temperatur zwischen 4 und 32°C 20 bis 60 Tage bebrütet wird. Nach Abtrennung der Pilze und deren Gefriertrocknung, Zerkleinerung und Extraktion nach bekannten Verfahren werden die Wirkstoffe mittels ebenfalls bekannten Methoden chromatographisch abgetrennt.

Durch diese einfache Arbeitsweise können hohe Ausbeuten an Biomasse mit einem hohen Gehalt an 3(-2-Dialkylamino-ethyl)-4-indolen erhalten werden, wobei die Pilze keine signifikanten Mengen an Psilocybin, Psilocin und Baeocystin mehr bilden.

Durch das nachfolgende Beispiel soll die Erfindung näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Es wurde ein Primärkultur von *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing. zur Beimpfung verwendet, die durch Keimung der Sporen auf 6%igem Malzagar, Überimpfung nach 14 Tagen und nachfolgender Kultivierung (20 Tage) auf 100ml des gleichen Agar gewonnen wurde.

Ein Mycelstück von etwa 2 cm × 2 cm wurde danach steril entnommen (Spatel) und durch Schütteln mit 30ml sterilem Wasser und 15g Sattelfüllkörper eine Suspension feiner Mycelflöckchen erzeugt. 10 ml des Gemisches dienten zur Beimpfung von 100g eines autoklavierten Gemisches aus 50% trockenem Kuhdung, 25% Weizenstroh und 25% Wasser, wobei nach 0,5g 3-(2-Dipropylamino-ethyl)-indolhydrochlorid (in 10ml Wasser) vor der Sterilisation zugegeben worden ist. Nach 3 Wochen begann die Fruchtkörperbildung, die in 5 Ertragswellen abließ.

Ausbeute: 18g trockene Fruchtkörper

Durch Extraktion der feingepulverten Pilze mit 3mal 500ml Methanol, Filtration, Eindampfen i. Vak. (20°C) und Säulenchromatographie an Cellulosepulver (30cm Säule) wurde 3-(2-Dipropylamino-ethyl)-4-hydroxyindol (Fp: 102°C, Ausbeute: 420mg) nach dem Umkristallisieren aus Essigester/Chloroform als weiße Kristalle dargestellt. Als Laufmittel bei der SC diente wassergesättigtes n-Butanol.

Es konnten keine weitere Indole in den Pilzen nachgewiesen werden.