



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 236 943 A5

4(51) C 12 P 15/00
C 12 P 17/16
C 12 P 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 P / 276 812 6	(22)	30.05.85	(44)	25.06.86
(31)	P3420954.9	(32)	01.06.84	(33)	DE

(71)	siehe (73)
(72)	Wilke, Detlef, Dr., DE; Weber, Alfred, Dr., Person mit ständigem Wohnsitz in Berlin (West)
(73)	Schering AG, 1000 Berlin (West) 65, Müllerstraße 170-178, WB und Bergkamen, DE

(54) Verfahren zur Herstellung von Chanoclain

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Chanoclain beansprucht, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Mikroorganismus *Claviceps spec. DSM2837* kultiviert und das gebildete Chanoclain nach Beendigung der Fermentation isoliert.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Chanoclavlin, **gekennzeichnet dadurch**, daß man den Mikroorganismus *Claviceps spec.* DSM 2837 kultiviert und das gebildete Chanoclavlin nach Beendigung der Fermentation isoliert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Chanoclavlin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Chanoclavlin = 2-Methyl-3-[1,3,4,5-tetrahydro-4-(methylamino)-benz(cd)-indol-5-yl]-2-propen-1-ol ist bekanntlich eine Vorstufe zur Biosynthese pharmakologisch wirksamer Ergotalkaloide und kann unter anderem zur Herstellung pharmakologisch wirksamer Verbindungen verwendet werden. (J. Med. Chem., 17, 1974, 300).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Suche nach einem Verfahren zur Herstellung von reinem Chanoclavlin.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Es wurde gefunden, daß ein Pilzstamm *Claviceps spec.* Chanoclavlin in hohen Ausbeuten und praktisch frei von anderen Ergotalkaloiden in das Kulturmedium ausscheidet. Dieser Stamm *Claviceps spec.* wurde aus einem Mutterkorn einer wild wachsenden Tresse (*Bromus*) isoliert. Er hat die interne Bezeichnung SCHERING, MBCE 373113 und ist bei der deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 2837 hinterlegt. Der Stamm bildet auf Agarmedien mit Glucose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle und Asparagin, Ammoniumsuccinat oder Ammoniumcitrat als Stickstoffquelle kompakte, stark gefaltete, weiße im Alter rötliche Kolonien, die aus Hyphen bestehen, die im Alter stark lichtbrechende Vakuolen aufweisen.

Die Hyphen haben einen Durchmesser von 3 bis 4 µm. Konidien werden nicht gebildet. Der Koloniedurchmesser beträgt nach 10 Tagen Kulturzeit 3 bis 4 cm und nach 20 Tagen Kulturzeit 6 bis 7 cm.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird unter Bedingungen durchgeführt, die man üblicherweise zur Anzucht von Pilzkulturen für eine Stoffwechselsynthese anwendet. So werden zunächst in allgemein üblichen Vorversuchen die günstigsten Fermentationsbedingungen, wie z. B. die Auswahl des günstigsten Nährmediums, der technischen Bedingungen wie Temperatur, Belüftung pH-Wert und der optimalen Zeiten für die Germination und die Entwicklung des Mikroorganismus ermittelt.

Als Kohlenstoffquelle kann für das Fermentationsmedium beispielsweise Glucose oder Saccharose verwendet werden. Als Stickstoffquelle dient unter anderem Asparagin, Ammoniumsuccinat oder Ammoniumcitrat. Ferner enthält das Medium die nötigen Wachstumsstoffe (beispielsweise Hefeextrakt) und Mineralstoffe (Kalium-, Magnesium-, Kalzium-, Eisen- und Zink-Kationen sowie Sulfat, Phosphat und Nitrat-Anionen in der üblicherweise angewendeten Konzentration).

Die Fermentation kann ein- oder zweistufig erfolgen, wobei das für die Vorkultur verwendete Medium mit dem der Hauptkultur identisch sein oder von diesem verschieden sein kann. Anzucht und Vermehrung erfolgen vorzugsweise bei einer niederen Konzentration an Kohlenstoffquelle (10 bis 100 g/l), die Chanoclavlin-Erzeugung selbst vorzugsweise bei höherer Konzentration an Kohlenstoffquelle (100 bis 300 g), wobei als Kohlenstoffquelle vorzugsweise Glucose verwendet wird.

Zu Beginn der Fermentation wird der pH-Wert des Mediums vorzugsweise in einem Bereich von 4 bis 6 eingestellt. Die Züchtungstemperatur liegt im Bereich von etwa 10 bis 35°C, vorzugsweise im Bereich von 20 bis 30°C. Die Kulturbedingungen sind streng aerob. Die optimale Fermentationszeit wird durch Analyse des gebildeten Chanoclavins in üblicher Weise ermittelt. Nach erfolgter Fermentation wird das gebildete Festoclavin in an sich bekannter Weise isoliert, beispielsweise indem man die Fermentationsansätze mit einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Ethylacetat, Methylisobutylketon, Dichlormethan, Chloroform oder Tetrachlorethan extrahiert, die Extrakte einengt und das erhaltene Rohprodukt durch Chromatographie und/oder Kristallisation reinigt.

Das nachfolgende **Ausführungsbeispiel** dient zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Beispiel

Claviceps spec. DSM 2837 wird auf einem Nährmedium angezüchtet, welches folgende Komponenten enthält: Saccharose (100 g/l), Citronensäure (10 g/l), Hefeextrakt (0,1 g/l), Kaliumhydrogenphosphat (500 mg/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (300 mg/l), Ammoniumsulfat (69 mg/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1 g/l), Eisensulfat-Heptahydrat (7 mg/l), Zinksulfat-Heptahydrat (6 mg/l). Das Nährmedium ist auf pH 5,1 eingestellt. Die Anzuchtkultur wird 14 bis 28 Tage bei 30°C im Brutschrank aufbewahrt.

Ein ca. 1 cm² großes Mycelstück wird mittels eines Ultraturrax unter sterilen Bedingungen in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung zerkleinert und damit 50 ml eine Vorkultur enthaltend Glucose (50 g/l), Citronensäure (7,5 g/l), Kaliumdihydrogenphosphat (500 mg/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (300 mg/l), Ammoniumnitrat (6 g/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1 g/l), Zinksulfat-Heptahydrat (6 mg/l), Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat (7 mg/l), Hefeextrakt (100 mg/l) — eingestellt auf pH 5,1 — die sich in einem 500 ml Erlenmeyerkolben befindet, beimpft und auf einem Rundschüttler 4 Tage lang bei 24°C und 220 Umdrehungen pro Minute kultiviert.

5 ml der so erhaltenen Vorkultur werden in 50 ml eines Mediums enthaltend Saccharose (200 g/l), Citronensäure (10 g/l), Hefeextrakt (0,1 g/l), Kaliumhydrogenphosphat (500 mg/l), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (300 mg/l), Ammoniumsulfat (6 g/l), Calciumnitrat-Tetrahydrat (1 g/l), Eisensulfat-Heptahydrat (7 mg/l) und Zinksulfat-Heptahydrat (6 mg/l) — eingestellt auf pH 5,1 — die sich in einem 500 ml Erlenmeyerkolben befindet, überführt und 9 Tage lang bei 24°C auf einem Rundschüttler mit 240 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Dann wird das Kulturmedium abfiltriert und der Gehalt an Chanoclavin mittels der van Urk-s-Reaktion (Mikrochim. Acta, 1959, 619–630) fotometrisch ermittelt. Die Konzentration des Kulturfiltrates beträgt 390 mg/l. Dünnschichtchromatographisch sind keine weiteren Ergotalkaloide nachweisbar.