(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461 (11) **211 582**

Int.Cl.³ 3(51) **C 12 P 17/18**
C 12 P 21/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 P / 256 213 8 (22) 06.08.82 (44) 18.07.84
(31) 5104/81-5 (32) 07.08.81 (33) CH

(71) siehe (73)
(72) KOBEL, HANS,DR.;SANGLIER, JEAN-JACQUES,DR.;TSCHERTER, HANS;BOLLIGER, GEORG,DR.;CH;
(73) SANDOZ AG;BASEL, CH

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ERGOPEPTINDERIVATEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von cyclischen 9'-Thia-peptidergotalkaloiden, die von fermentativ herstellbaren 9'-Methylen-peptidergotalkaloiden abgeleitet sind. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß man einer flüssigen Kultur eines die entsprechende 9'-Methylen-Verbindung produzierenden Stammes L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder ein Salz dieser Säure zugibt und die erhaltene Verbindung gewünschtenfalls in ein Säureadditionssalz überführt. Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen weisen Dopaminrezeptoren stimulierende, Prolaktin-sekretionshemmende, gefäßtonisierende, antidepressive und vigilanzerhöhende Eigenschaften auf.

62 621 18
Ausscheidungsanmeldung
aus AP C 07 D /242 325/7

Verfahren zur Herstellung von Ergopeptinderivaten

Anwendungsgebiet der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Ergopeptinderivaten.
Die Erfindung betrifft insbesondere die Herstellung von cyclischen 9'-Thia-peptidergotalkaloiden, die von fermentativ herstellbaren 9'-Methylen-peptidergotalkaloiden abgeleitet sind, in Form der freien Basen oder ihrer Säureadditionssalze.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.
Es sind auch keine Angaben über Verfahren zur Herstellung von 9'-Thia-peptidergotalkaloiden bekannt.

Ziel der Erfindung

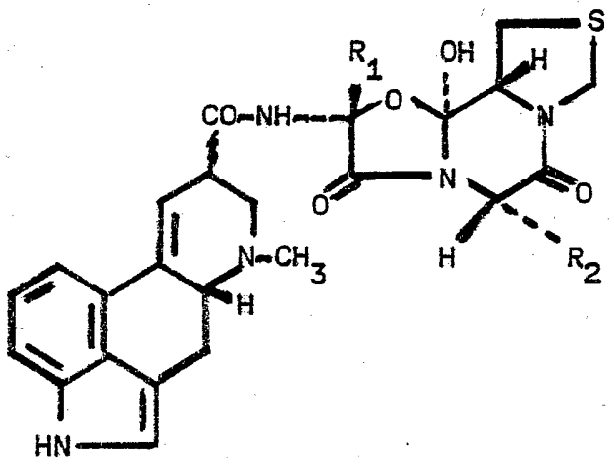
Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung von neuen Verbindungen mit wertvollen pharmakologischen Eigenschaften und einem breiten Wirkungsprofil.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen mit den gewünschten Eigenschaften und Verfahren zu ihrer Herstellung aufzufinden.

Diese Verbindungen können erhalten werden, indem man einer flüssigen Kultur eines die entsprechende 9'-Methylen-Verbindung produzierenden Stammes L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder ein Salz dieser Säure zugibt.

Insbesondere gelangt man zu den Verbindungen der Formel I,



I

worin entweder

R_1 für Methyl steht und R_2 Isobutyl oder Benzyl bedeutet
oder

R_1 für Äthyl steht und R_2 Benzyl bedeutet
oder

R_1 für Isopropyl steht und R_2 Isopropyl, sek.-Butyl, Isobutyl oder Benzyl bedeutet,

und ihren Säureadditionssalzen, indem man einer flüssigen Kultur eines die entsprechende 9'-Methylen-Verbindung produzierenden Stammes L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder ein Salz dieser Säure zugibt und die erhaltenen Verbindungen gewünschtenfalls in ihre Säureadditionssalze überführt.

Für die Salzbildung geeignete Säuren sind z. B. die Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Maleinsäure, Fumarsäure und Weinsäure.

Als Stämme, die 9'-Methylenderivate der Verbindungen der Formel I produzieren, können Stämme von Claviceps purpurea verwendet werden sowie solche, die aus einem Ausgangsstamm von Claviceps purpurea durch Mutation unter Einwirkung von Strahlen oder Behandlung mit mutagenen Substanzen oder durch Selektion gewonnen werden können.

Zur Herstellung von 9'-Thia-ergotamin und 9'-Thia-ergotaminin zum Beispiel wird als bevorzugter Ergotamin/Ergotaminin produzierender Stamm die Claviceps purpurea Mutante NRRL 12043 verwendet. Eine Kultur davon wurde am 20. 9. 1979 beim United States Department of Agriculture (Northern Regional Research Center), Peoria, Ill., USA, unter der Kulturnummer NRRL 12043 deponiert.

Zur Herstellung von 9'-Thia-ergocristin und 9'-Thia-ergocristinin wird als bevorzugter Ergocristin/Ergocristinin produzierender Stamm die Claviceps purpurea Mutante NRRL 12044 verwendet. Eine Kultur davon wurde am 20. 9. 1979 bei der oben erwähnten Deponierungsstelle unter der Kulturnummer NRRL 12044 deponiert.

Die zur Herstellung der übrigen Verbindungen der Formel I verwendbaren Stämme sind bekannt und stehen ebenfalls der Öffentlichkeit zur Verfügung.

Charakteristikum und fermentative Gewinnung der Stämme NRRL 12043 und 12044

a) Charakteristikum des Stammes NRRL 12043

Der Ausgangspilzstamm wurde aus einem auf Bromus im Wallis (Schweiz) gefundenen Sklerotium, welches Ergotamin enthielt, isoliert. Durch mehrere mutagene Behandlungsschritte unter Verwendung von Ultra-Violett-Strahlen und Chemikalien gelangte man zu dem erfindungsgemäß verwendeten Stamm NRRL 12043, welcher folgendermaßen charakterisiert werden kann:

Es wird ein kleines Mycelstück des Stammes NRRL 12043 im Zentrum einer Agarplatte mit einem Medium der nachfolgend angegebenen Zusammensetzung ausgeimpft:

60 g Saccharose, 10 g Asparagin, 0,5 g Casamino-Acids (Difco), 0,25 g KH_2PO_4, 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0,125 g KCl, 16 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 15 g Agar und dest. Wasser ad 1 Liter. Der pH-Wert wird mit einer 25%igen Ammoniak-Lösung auf 6,0 eingestellt. Das Medium wird 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Bei 24 °C ist nach 7 Tagen eine Kolonie von etwa 3 cm Durchmesser, nach 14 Tagen von etwa 5 cm und nach 20 Tagen von etwa 8 cm Durchmesser entstanden. Die Kolonie ist gewölbt und leicht gefaltet. Der Rand ist diffus. Die Farbe der Kolonie ist im Zentrum beige-violett und am Rand beige-grau. Eine 20 Tage alte Kolonie enthält pro cm^2 ca. $1,10^8$ Konidien. Diese sind oval und haben Dimensionen von 6 - 12 x 4 - 7 µ.

b) Charakteristikum des Stammes 12044

Der Ausgangspilzstamm wurde aus einem auf Roggen in Nordamerika gefundenen Sklerotium, welches Ergocristin enthielt, isoliert. Durch mehrere mutagene Behandlungsschritte unter Verwendung von Ultra-Violett-Strahlen und Chemikalien gelangte man zu dem erfindungsgemäß verwendeten Stamm NRRL 12044, welcher folgendermaßen charakterisiert werden kann:

Es wird ein kleines Mycelstück des Stammes NRRL 12044 im Zentrum einer Agarplatte mit einem Medium der nachfolgend angegebenen Zusammensetzung ausgeimpft:

70 g Malzextrakt (Wander), 30 g Kartoffeln (Stocki, Knorr), 15 g Agar und dest. Wasser ad. 1 Liter. Der pH-Wert beträgt 5,3 - 5,7. Das Medium wird 20 Minuten bei 120 ^{o}C sterilisiert. Bei 24 ^{o}C ist nach 7 Tagen eine Kolonie von etwa 2 cm Durchmesser, nach 14 Tagen von etwa 4 cm und nach 20 Tagen von etwa 5 cm Durchmesser entstanden.

Das Mycel ist flach gewölbt und mit einem weißen, in den Luftraum ragenden, watteartigen Hyphengeflecht bedeckt. Im Zentrum wird ein kraterförmiger Höcker von etwa 1 cm Durchmesser ausgebildet. Von ihm gehen radiale Falten aus. Das dem Agar aufliegende Mycel ist violett gefärbt. Es entstehen konzentrische Zonen mit stärkerer und solche mit schwächerer Pigmentierung. Der Rand ist diffus. Ein 20 Tage altes Mycel enthält pro cm^2 ca. 1,10^8 Konidien. Diese streuen in ihren Dimensionen ziemlich stark (5 - 12 x 3 - 7 µ; meist jedoch 5 - 6 x 3 µ). Das Mycel enthält keine Alkaloide.

Vermehrung und Impfstoffherstellung

a) NRRL 12043

Vermehrung und Impfstoffherstellung des Stammes NRRL 12043 können in der Weise erfolgen, daß man von einer der oben beschriebenen Kolonien die Konidien in sterilem Wasser abschwemmt und damit Schrägagarröhrchen mit dem Agarmedium beimpft, bestehend aus: 70 g Malzextrakt (Wander), 30 g Kartoffeln (Stocki, Knorr), 15 g Agar und dest. Wasser ad 1 Liter. Der pH-Wert beträgt 5,3 - 5,7. Das Medium wird 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Nach 14 Tagen enthält eine solche Schrägagarkultur (12 ml Medium in einem Reagenzglas von 18 mm Durchmesser und 20 cm Länge, keilförmig ausgelegt) etwa 1.10^9 Konidien. Von einer solchen Schrägagarkultur werden Konidien in sterilem Wasser aufgeschwemmt, und dabei wird eine Konzentration von 10^6 - 10^7 Sporen/ml hergestellt. Mit je 0,5 ml dieser Suspension werden Schrägagarröhrchen mit dem gleichen Medium gleichmäßig beimpft. Diese Kulturen werden bei 24 °C während 14 Tagen bebrütet. Hierauf werden sie bei -40 °C gelagert.

b) NRRL 12044

Vermehrung und Impfstoffherstellung des Stammes NRRL 12044 können in der Weise erfolgen, daß man von einer der oben beschriebenen Kolonien die Konidien in sterilem Wasser abschwemmt und damit Schrägagarröhrchen mit dem oben beschriebenen Agarmedium beimpft. Nach 18 Tagen enthält eine solche Schrägagarkultur (12 ml Medium in einem Reagenzglas von

18 mm Durchmesser und 20 cm Länge, keilförmig ausgelegt) etwa 1 - 2.10^9 Konidien. Von einer solchen Schrägagarkultur werden Konidien in sterilem Wasser aufgeschwemmt, und dabei wird eine Konzentration von 10^6 - 10^7 Sporen/ml hergestellt. Mit je 0,5 ml dieser Suspension werden Schrägagarröhrchen mit dem gleichen Medium gleichmäßig beimpft. Diese Kulturen werden bei 24 °C während 14 Tagen bebrütet. Hierauf werden sie bei -40 °C gelagert.

Vorkulturen

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Sporen erst über Vorstufe(n) heranzuzüchten, bevor das Produktionsmedium angeimpft wird. Anfänglich soll man ein Medium wählen, in welchem gute Sporenkeimung und ein schnelles Mycelwachstum stattfinden. Für ein solches Medium sind geeignet: eine Kohlenstoffquelle in reichlicher Konzentration in Form eines Mono- oder Disaccharids, gegebenenfalls in Kombination mit einem Polyalkohol, eine Stickstoffquelle in Form einer Aminosäure oder eines Ammoniumsalzes, ferner Mineralsalze, Spurenelemente und komplexe Zusätze aus pflanzlichen Samen. Das pH wird vorteilhaft zwischen 5 und 7 eingestellt. Das Medium wird in der ersten Stufe mit Konidien reichlich beimpft und auf der Schüttelmaschine oder in Fermentern von verschiedenen Größen bei 22 - 26 °C während 4 - 7 Tagen inkubiert. Es entsteht eine dichte Kultur aus lockeren, watteartigen, 2 - 3 mm messenden, unpigmentierten Mycelflocken, welche aus langen Hyphen von 3 - 6 µ Durchmesser bestehen.

Hauptkulturen

Mit einem Teil der in einer oder gegebenenfalls mehreren Vorstufen erhaltenen Kultur wird das Produktionsmedium beimpft, welches vorteilhaft eine solche Zusammensetzung aufweist, daß in kurzer Zeit ein hohes Mycelgewicht erreicht wird. Als beste und billigste Kohlenstoffquelle hat sich Saccharose erwiesen, als Stickstoffquelle Ammoniumsalze, wie Oxalat, Zitrat, Succinat und Formiat. Ferner sollen Mineralsalze und als Spurenelemente Eisen und Zink zugegen sein. Die Kulturen werden entweder in Erlenmeyerkolben oder in Fermentern von verschiedenen Größen durchgeführt. Wichtig ist eine gute Belüftung. Die optimale Temperatur liegt bei 24 °C.

Am Anfang der Alkaloidbildung, normalerweise zwischen dem 3. und 6. Tag der Hauptkultur, werden 1 - 5 g/Liter L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder von einem Salze dieser Säure, wie z. B. das Kalium-, Natrium- oder Ammoniumsalz, zur Hauptkultur gegeben. Hierauf werden die Kulturen weiter während 6 - 12 Tagen bebrütet. Es entsteht im Verlaufe von 9 - 18 Tagen eine dichte Kultur, die hauptsächlich aus 0,5 - 3 mm langen und 0,1 - 1 mm dicken zylindrischen kompakten Mycelpartikeln neben feinen Flocken besteht. Die Mycelpartikel zeigen in ihrer Struktur das Bild eines plectenchymatischen Gewebes aus kugeligen oder polyedrischen bis kurzzylindrischen, dickwandigen und stark vakuolisierten Zellen von 6 - 12 x 6 - 14 µ, vornehmlich 8 x 9 µ, welches von bis zu 100 µ langen Hyphen durchzogen ist. Sie sind bräunlich pigmentiert. Das Kulturfiltrat ist ebenfalls bräunlich gefärbt.

Wenn sich die Zunahme des Gewichtes und des Alkaloidgehaltes des Mycels verringert, können nach an sich bekannten Methoden die Alkaloide mit organischen Lösungsmitteln aus dem gesamten Kulturbrei extrahiert werden, oder man trennt das Mycel durch Filtration oder Zentrifugation vom Filtrat und extrahiert beide Teile separat. Der Hauptanteil der Peptidalkaloide ist im Mycel angereichert.

Isolierung der Verbindungen der Formel I

Diese Schwefel enthaltenden Ergotpeptine lassen sich aus der Kulturbrühe, aus dem Kulturfiltrat oder as dem Mycel durch bekannte extraktive Verfahren isolieren. Die Reinigung erfolgt unter Anwendung üblicher Reinigungsschritte, wie zum Beispiel durch Fällungen aus aktiven mit inaktiven Lösungsmitteln oder durch Überführen in schwerlösliche Salze. Besonders geeignet sind bekannte Reinigungsverfahren, wie z. B. Chromatographie an Aluminiumoxiden, Kieselgelen, Sephadex LH-20 usw. in den jeweils geeigneten Lösungsmittelsystemen. Wie die bekannten Ergotpeptine sind auch diese neuen 9'-Thia-ergopeptine gegen Tageslicht empfindlich. In freier Form und in polaren Lösungsmitteln isomerisieren sie bis zu einem bestimmten Gleichgewicht in die jeweils andere Form.

In Salzform, wie sie z. B. mit Methansulfonsäure hergestellt werden können, sind 9'-Thia-ergotamin und 9'-Thia-ergocristin über längere Zeit stabil.

Erfindungsgemäß erhaltene Verbindungen können, falls er-

wünscht, nach an sich bekannten Methoden in weitere Verbindungen überführt werden.

So können die Verbindungen der Formel Ia in Stellung 1 und/oder 2 und/oder 6 alkyliert werden.

Ferner können die Verbindungen der Formel Ia in Stellung 9, 10 reduziert werden.

Außerdem können die Verbindungen der Formel Ia in Stellung 2 halogeniert werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Sie weisen im Tierversuch interessante pharmakologische Eigenschaften auf und können daher als Heilmittel verwendet werden.

Insbesondere zeigen diese Verbindungen eine Dopaminrezeptoren stimulierende Wirkung. Die dopaminergen Eigenschaften konnten an Ratten, bei denen durch eine 6-Hydroxydopamin-Injektion in die substantia nigra eine unilaterale Verletzung der nigro-neostriatalen Dopaminbahn erzeugt wurde, mit Dosen zwischen etwa 0,5 bis 100 mg/kg festgestellt werden [Methode nach U. Ungerstedt, Acta physiol. scand. Suppl. 367, 69 - 93 (1971)]. Nach Verabreichung des Wirkstoffes war eine deutliche Aktivierung dadurch erkennbar, daß die Ratten in Richtung der nicht denervierten Seite rotierten. Die neuen Substanzen können aufgrund ihrer dopaminergen Eigenschaften zur Behandlung von Parkinsonismus Anwendung finden.

Ferner besitzen die neuen Verbindungen eine Prolaktinsekretions-hemmende Wirkung. So hemmen sie bei der Ratte die Implantationen nach subkutaner Applikation von Dosen zwischen 0,01 und 1 mg/kg und die Laktation mit Dosen von 1 bis 10 mg/kg p. o. [Lit.: Experientia 34, 1330 (1978)]. Die neuen Substanzen können aufgrund ihrer Prolaktinsekretions-hemmenden Eigenschaften z. B. zur Laktationshemmung, Galaktorrhoehemmung, zur Behandlung des hyperprolaktinaemischen Hypogonadismus und der Akromegalie oder zur Behandlung von Prolaktinomen Anwendung finden. Ferner bewirken die neuen Substanzen am Schlaf/Wachzyklus bei der chronisch implantierten Ratte ab ca. 3 mg/kg i. p. oder 10 mg/kg p. o. eine Reduktion der Dauer des paradoxalen Schlafes und eine Verlängerung des Wachzustandes [siehe J. M. Vigouret et al., Pharmacology 16, 1, 156 - 173 (1978)]. Überdies bewirken sie bei 0,3 mg/kg i. p. eine Erhöhung des Glukosestoffwechsels in Hirnnervenkernen sensorischer Informationsverarbeitung (Methode nach L. Solokoff, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 1981, 1, 7 - 36; H. E. Savaki et al., Brain Research 1982, 233, 347 und J. McCulloch et al., Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 1981, 1, 133 - 136).

Aufgrund dieser Resultate sind die neuen Substanzen für die Behandlung der senilen Demenz, insbesondere im Frühstadium und zur Vigilanzerhöhung geeignet.

Außerdem besitzen die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen vasokonstriktorische Aktivität, welche in vitro an Spiralstreifen der Arteria carotis externa des Hundes

[E. Müller-Schweinitzer, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 292, 113 - 118 (1976)], mit Dosen ab 10 nM/Liter gezeigt werden kann.

Aufgrund ihrer vasokonstriktorischen Wirkung werden die neuen Substanzen zur Behandlung der Migräne verwendet.

Ferner bewirken sie an der Ratte mit zerstörtem Gehirn und Rückenmark [Brit. J. Pharmac. Chemother. 30 (1967), 78 - 87] mit einer Dosis von etwa 5 bis etwa 50 µg/kg i. v. einen langanhaltenden pressorischen Effekt verbunden mit einer Blutdrucksteigerung. An der Mellander-Katze [Angiologica 3 (1966), 77 - 99] bewirken sie eine starke, dosisabhängige und langanhaltende Konstriktion der Kapazitätsgefäße in Dosen von etwa 0,5 bis etwa 50 µg/kg i. a.

Aufgrund dieser Aktivität können die Substanzen als venentonisierende Mittel Anwendung finden.

Schließlich bewirken die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen aufgrund der Ergebnisse am Schlaf/Wach-Zyklus eine serotoninerge Wirkung. Im Hinblick auf diese Wirkung und die Ergebnisse am Ungerstedt-Modell können sie als Antidepressiva vor allem bei älteren Leuten Anwendung finden.

Ausführungsbeispiele

In den nachfolgenden Beispielen, die die Erfindung näher erläutern, erfolgen alle Temperaturangaben in Celsiusgraden und sind unkorrigiert.

Beispiel 1:

9'-Thia-ergotamin und 9'-Thia-ergotaminin

1. Züchtung des Stammes NRRL 12043

a) Vorkultur

Die Konidien einer Schrägagarkultur des Claviceps purpurea Stammes NRRL 12043 (etwa 10^9) werden in 10 ml sterilem Wasser suspendiert. Mit 1 ml dieser Konidien-Suspension werden 200 ml eines Vorkulturmediums folgender Zusammensetzung

		g/Liter
Saccharose		100
Proflo		10
Ammoniumoxalat		3
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$		1
KH_2PO_4		0,25
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$		0,25
KCl		0,125
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$		0,0166
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$		0,0068
destilliertes Wasser	ad	1 Liter ,

welches sich in 500-ml-Erlenmeyerkolben befindet, angeimpft; das pH wird mit NH_4OH auf 6,5 eingestellt. Das Medium wird 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Diese Vorkultur wird bei 24 °C rotierend 5 Tage geschüttelt (180 UpM, 5 cm Kreis). Am Ende des Wachstums hat die Kultur ein pH von 5,3 und ein Myceltrockengewicht von 22 g/L.

b) Hauptkultur

Mit 10 ml der Vorkultur werden 50 ml eines Hauptkulturmediums folgender Zusammensetzung

		g/Liter
Saccharose		240
Ammoniumoxalat		9,6
$Ca(NO_3)_2 . 4 H_2O$		2,5
$MgSO_4 . 7 H_2O$		0,625
KH_2PO_4		0,625
KCl		0,312
$FeSO_4 . 7 H_2O$		0,0252
$ZnSO_4 . 7 H_2O$		0,0102
destilliertes Wasser	ad	1 Liter ,

welches sich in 500-ml-Erlenmeyerkolben befindet, angeimpft; das pH wird mit NH_4OH-25%ig auf 6,2 eingestellt. Das Medium wird 20 Minuten bei 110 ^{o} sterilisiert.

Diese Kultur wird bei 24 ^{o} auf einer Rundschüttelmaschine (180 UpM, 5 cm Kreis) inkubiert. Nach 4 Tagen Bebrütungszeit werden pro Kultur 90 mg L-Thiazolidin-4-carbonsäure zugegeben. Die Kulturen werden noch 10 Tage auf der Rundschüttelmaschine inkubiert. Nach beendeter Fermentation werden die Kulturen abfiltriert. Das Mycelium wird schonend getrocknet. Das Trockenmycelgewicht der Hauptkultur beträgt 85 g/L. Der Alkaloidgehalt beträgt 12 mg/g. Der Anteil an 9'-Thia-ergotamin + 9'-Thia-ergotaminin beträgt 10 % des Gesamtalkaloidgehaltes.

2. Isolierung der Titelverbindungen

500 g Trockenmycel werden zweimal mit je 1600 ml Methanol + 2 % konz. Ammoniak sowie zweimal mit je 1200 ml Methanol während je 5 Minuten mit einem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert und die vereinigten Filtrate im Vakuum bei max. 40 °C Badtemperatur eingedampft (ca. 50 g weinroter Rückstand). Dieser Rückstand wird in 500 ml Methanol gelöst und in einem Chromatographie-Rohr von 10 cm Durchschnitt durch 500 g Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe II (Woelm) filtriert, mit 2000 ml Methanol nachgewaschen und das gesamte Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft (25 g gelber Schaum). Dieser Rückstand wird nun an der 200fachen Menge Kieselgel 60 (Merck) in Methylenchlorid + 2 % Methanol chromatographisch aufgetrennt. Die Fraktions-Rückstände werden dünnschichtchromatographisch untersucht und diejenigen Fraktionen, welche nur Substanzflecke entsprechend 9'-Thia-ergotamin enthielten (vgl. Rf-Werte in Tabelle 1), vereinigt.

9'-Thia-ergotamin:

Die Fraktionen, die nach dünnschichtchromatographischer Analyse und entsprechend ihrem Rf-Wert nur 9'-Thia-ergotamin enthalten, werden in Essigester gelöst, durch eine Talkschicht blankfiltriert und nach Konzentrierung im Vakuum mit wenig Hexan versetzt, wobei das Alkaloid auskristallisiert. Umkristallisation aus dem gleichen Lösungsmittel liefert reine Kristalle von weißer bis gelblicher Farbe. Smp.: ab 199 °C langsame Zersetzung; $[\alpha]_D^{20}$ = -165 ° (c = 0,5 in Chloroform).

9'-Thia-ergotamin-methansulfonat: 180 mg

9'-Thia-ergotamin werden in wenig Äthanol gelöst und mit einer alkoholischen Lösung, enthaltend 29 mg Methansulfonsäure, versetzt, wobei das Alkaloid als Methansulfonat auskristallisiert. Umkristallisation aus Methanol liefert ein reines, weißes Salz.
Smp.: ab 211 °C Zersetzung; $[\alpha]_D^{20}$ = + 76 ° (c = 0,51 in Methanol).

9'-Thia-ergotaminin:

Die Chromatogrammfraktionen mit dünnschichtchromatographisch einheitlichem Fleck und Rf-Wert (siehe Tabelle 1) werden in Essigester gelöst, vereinigt und durch eine Talkschicht klarfiltriert. Die konzentrierte Lösung wird mit wenig Hexan versetzt, wobei das Alkaloid in weißer kristalliner Form ausfällt. Umkristallisation aus dem gleichen Lösungsmittel ergibt die reine Verbindung.
Smp.: ab 199 °C Zersetzung; $[\alpha]_D^{20}$ = + 343 ° (c = 0,55 in Chloroform).

Tabelle 1

Dünnschichtchromatographische Rf-Werte im Vergleich zu Ergotamin (Et) und Ergotaminin (Et-in).

Schicht und Fließmittel	Thia-Et	Et	Thia-Et-in	Et-in
Alox[1] Essigester/sec.Butanol 9 : 1	0,44	0,34	0,68	0,59
Toluol/iso-Propanol 9 : 1	0,58	0,50	0,69	0,63
Toluol/iso-Propanol 19 : 1	0,30	0,24	0,58	0,46
Kieselgel[2] Toluol/iso-Propanol 85 : 15	0,15	0,11	0,43	0,31
CH_2Cl_2/MeOH 93 : 7	0,25	0,22	0,65	0,52

1) Aluminiumoxid-Fertigplatten Merck F 254 (Typ E)

2) Kieselgel-Fertigplatten Merck F 254.

Auf Dünnschichtplatten erscheinen die Substanzflecke im UV-Licht 254 nm als blauviolette und bei 366 nm als hellblaue Flecke. Auch können sie mit Joddämpfen als braune Flecke erkannt werden.

Das für die Ergotpeptine typische van Urk-Reagens bewährt sich ausgezeichnet zur Detektion der Substanzflecke. Nach dem Besprühen erscheinen diese Verbindungen mit blauvioletter Farbe, die durch Einwirkung des Tageslichtes oder durch Überströmen mit einem Hauch Königswasserdämpfen intensiviert werden.

Beispiel 2

9'-Thia-ergocristin und 9'-Thia-ergocristinin

1. Züchtung des Stammes NRRL 12044

Der Stamm NRRL 12044 wird analog zu Beispiel 3 gezüchtet. Das Trockenmycelgewicht der Hauptkultur beträgt 80 g/L. Der Alkaloidgehalt beträgt 10 mg/g. Der Anteil an Titelverbindungen beträgt 8 % des Gesamtalkaloidgehaltes.

2. Isolierung der Titelverbindungen

500 g Trockenmycel werden zweimal mit je 1500 ml Methanol + 2 % konz. Ammoniak und zweimal mit je 1500 ml Methanol mit einem Ultraturrax-Gerät je 5 Minuten homogenisiert. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum bei max. 40 °C Badtemperatur eingedampft (190 g weinroter Rückstand). Nach dem Lösen in 900 ml Methanol wird durch eine 10 cm hohe Schicht aus 600 g Aluminiumoxid (basisch, Aktivitätsstufe 2) filtriert, mit 2000 ml Methanol nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. (108 g). Dieser Rückstand wird nun in Methanol an 3000 g Sephadex LH-20 aufgetrennt und Fraktionen zu 200 ml aufgefangen und eingedampft. Die Fraktionsrückstände, die dünnschichtchromatographisch die neuen Thia-ergotpeptide enthielten, werden vereinigt (526 mg) und nochmals an 120 g Sephadex LH-20 in Methanol chromatographiert, woraus 156 mg reines Gemisch von 9'-Thia-ergocristin/-cristinin erhalten werden. Die Trennung dieser beiden Verbindungen erfolgte durch be-

kannte chromatographische Methoden an Kieselgel 60 (Merck) mit Methylenchlorid + 2 % Methanol.

9'-Thia-ergocristin:

Die Fraktionsrückstände, die nach dünnschichtchromatographischer Analyse und entsprechend ihrem Rf-Wert (vgl. Tabelle 2) nur 9'-Thia-ergocristin enthalten, werden vereinigt und aus Benzol kristallisiert (28 mg).
Smp.: 146 °C sintern unter langsamer Zersetzung; $[\alpha]_D^{20} = -176$ ° (c = 0,5 in Chloroform).

9'-Thia-ergocristinin:

Die Chromatogrammfraktionen, die sich dünnschichtchromatographisch einheitlich zeigen und den Substanzfleck mit den entsprechenden Rf-Werten (siehe Tabelle 2) aufweisen, werden vereinigt und aus Äthanol-Essigester kristallisiert.
Schmelzpunkt: 209 - 210 °C unter Zersetzung;
$[\alpha]_D^{20} = +344$ ° (c = 0,51 in $CHCl_3$).

Tabelle 2

Dünnschichtchromatographische Rf-Werte im Vergleich zu Ergocristin (Ec) und Ergocristinin (Ec-in).

Schicht und Fließmittel	Thia-Ec	Ec	Thia-Ec-in	Ec-in
Alox[1)]				
Essigester/sec.Butanol 9 : 1	0,68	0,63	0,78	0,70
Toluol/iso-Propanol 9 : 1	0,68	0,62	0,69	0,66
Toluol/iso-Propanol 19 : 1	0,50	0,42	0,58	0,47
Kieselgel [2)]				
Toluol/iso-Propanol 85 : 15	0,37	0,28	0,56	0,48
CH_2Cl_2/MeOH 93 : 7	0,47	0,41	0,70	0,60

1) Aluminiumoxid-Fertigplatten Merck F 254 (Typ e)

2) Kieselgel-Fertigplatten Merck F 254.

Zur Detektion der Substanzflecken siehe Beispiel 1.

Beispiel 3

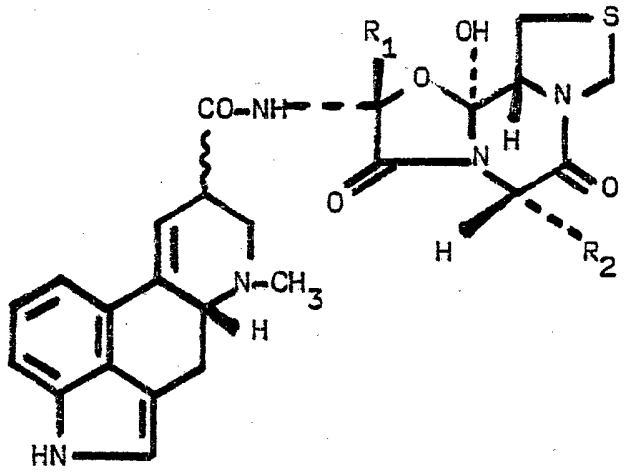
Analog zu Beispiel 1 oder 2 können auch das 9'-Thia-α-ergokryptin [Smp.: 203 - 205 °C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$ = + 46 °

(c = 0,7 in Dimethylformamid)] und das 9'-Thia-α-ergokryptinin [Smp.: 228 - 230 °C (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$ = + 281 ° (c = 0,8 in Dimethylformamid)] hergestellt werden, indem man einen Ergokryptin/Ergokryptinin produzierenden Stamm verwendet.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines cyclischen 9'-Thia-peptidergotalkaloids, das von einem fermentativ herstellbaren 9'-Methylen-peptidergotalkaloid abgeleitet ist, in Form der freien Base oder eines Säureadditionssalzes, gekennzeichnet dadurch, daß man einer flüssigen Kultur eines die entsprechende 9'-Methylen-Verbindung produzierenden Stammes L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder ein Salz dieser Säure zugibt und die erhaltene Verbindung gewünschtenfalls in ein Säureadditionssalz überführt.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man einer flüssigen Kultur eines die entsprechende 9'-Methylen-Verbindung produzierenden Stammes L-Thiazolidin-4-carbonsäure oder ein Salz dieser Säure zugibt und die erhaltene Verbindung der Formel (Ia)



Ia,

worin entweder

R_1 für Methyl steht und R_2 Isobutyl oder Benzyl bedeutet oder

R_1 für Äthyl steht und R_2 Benzyl bedeutet oder

R_1 für Isopropyl steht und R_2 Isopropyl, sek.-Butyl, Isobutyl oder Benzyl bedeutet,

gewünschtenfalls in ein Säureadditionssalz überführt.