



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 230 019 A1

4(51) C 12 P 17/10

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 D / 217 919

(22) 20.12.79

(44) 20.11.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 6, DD

(72) Baumert, Alfred, Dr. Dipl.-Chem.; Erge, Dieter, Dr. Dipl.-Biol.; Gröger, Detlef, Prof. Dr.; Maier, Walter, Dr. Dipl.-Chem.; Schmauder, Hans-Peter, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Schumann, Brigitte, Dr. Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Chanoclavin-I

(57) Es wird die Herstellung des Alkaloids Chanoclavin-I mit Hilfe des Stammes *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 180, ZIMET PA 138, seiner Mutanten oder Varianten beschrieben. Der Stamm bildet ein Gesamtalkaloidgemisch von 500–600 µg pro ml Kulturlösung, von dem mindestens 90 % der Alkaloide mit organischen Lösungsmitteln ausschüttelbar sind. Neben dem Chanoclavin-I, das etwa 80 % des Alkaloidgemisches ausmacht, wird Chanoclavin-I-aldehyd gebildet (etwa 20 % des Gesamtalkaloidgemisches). Weitere Alkaloide treten nicht auf. Der Stamm wird in aerober Fermentation in einem flüssigen Nährmedium, welches eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, eine assimilierbare Stickstoffquelle und Mineralsalze enthält, in emerser und/oder submerser Kultur bei einer Temperatur von 20–30 °C und einem pH-Wert von 4,0–6,2 während eines Zeitraumes von 7–35 Tagen kultiviert. Mehr als 95 % der gebildeten Alkaloide werden in das Nährmedium abgegeben, aus dem man die Alkaloide isoliert.

Verfahren zur Herstellung von Chanoclavin-I

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Chanoclavin-I.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Clavinalkaloide sind Vorstufen in der Biosynthese der Mutterkornalkaloide mit Peptidseitenkette. Sie werden von verschiedenen Claviceps-Stämmen gebildet. Einige Vertreter der Clavinalkaloide besitzen eine Wirkung als Prolactinhemmer. Eine Verwendung als Antiparkinsonmittel bietet sich ebenfalls an. Clavinalkaloide sind wertvolle Ausgangsstoffe für Partialsynthesen. Ausgehend vom Chanoclavin-I lassen sich modifizierte Secoergoline und Derivate des tetracyclischen Ergolins gewinnen. Es eröffnen sich so der pharmakologischen Anwendung von Mutterkornalkaloiden neue Möglichkeiten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Chanoclavin-I ist bisher nur in geringen Mengen zugänglich gewesen. In der Literatur sind drei Verfahren der Gewinnung mit Hilfe von Mikroorganismen beschrieben worden.

Der Stamm *Claviceps paspali* Li 342/SE 60 bildet in saprophytischer Kultur 400 µg Gesamtalkaloid pro ml Kulturlösung. 40 % dieser Menge sind Chanoclavin-I (Pharmazie 20, 523-524 (1965)). Bei diesem Verfahren werden neben Chanoclavin-I überwiegend Lysergsäurederivate gebildet, so daß die Aufarbeitung erschwert ist.

Italienische Autoren berichten über einen Stamm, der die Bezeichnung FI 82 trägt. Er bildet 150 - 200 μ g Chanoclavin/ml. Sie beschreiben die Bildung von "giant colonies", deren unterschiedliche Sektoren eine große Variabilität in der Fähigkeit zur Alkaloidbildung besitzen. Eine Sektorart kann sogar die Fähigkeit zur Alkaloidbildung völlig verlieren (Fermentation Advances 1969, 611-628). Bei diesem Verfahren ist nicht ersichtlich, ob Chanoclavin-I oder ein Gemisch von Chanoclavin-Isomeren entsteht.

In einer dritten Arbeit wird die Bildung von 158 mg Chanoclavin-I/l Nährmedium beschrieben. Die Autoren kultivierten den Pilz *Balansia strangulans* 38 Tage in emerser Kultur (J. gen. Microbiol. 113, 119-126 (1979)). Dieses und das vorgenannte Verfahren haben den Nachteil einer langen Fermentationsdauer, da nur bei emerser Kultivation Alkaloid gebildet wird.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, nach einem günstigen Verfahren das Alkaloid Chanoclavin-I herzustellen, um seine pharmazeutische Verwendung, gegebenenfalls über partialsynthetische Umwandlungen, zu ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Chanoclavin-I zu entwickeln, nach dem die Produktion des Alkaloids auch in submerser Kultivation erfolgen kann und bei dem keine bei der Aufarbeitung störenden Nebenalkaloide gebildet werden.

Erfindungsgemäß werden zur Herstellung von Chanoclavin-I der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 180, seine Mutanten oder Varianten verwendet. Die Kultivation zur Charakterisierung von *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 180 erfolgte auf bzw. in

den in Tabelle 1 zusammengestellten Medien. Der neue Stamm besitzt die folgenden makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften:

Makroskopisches Aussehen

Alter der Kulturen: 4 Wochen

Agar NL 126: Einzelkolonien: Ø 2 - 3 cm, scharf aufgesetzt, kraterförmig gefaltet, Höhe 0,5-1,0 cm.

Farbe: grau mit leichtem hellen Überzug
Im UV-Licht keine Fluoreszenz

Agar NL 829: Einzelkolonien vom Ø 1,5 - 2,0 cm, scharf aufgesetzt, kraterförmig zerklüftet, erhaben.

Höhe: etwa 0,8 - 1,2 cm
Farbe: hellrötlich-violett
Im UV-Licht keine Fluoreszenz

Mikroskopisches Aussehen

Agar NL 126: Alter: 4 Wochen
Dünne Hyphen, septiert, zentrales oder wandständiges Plasma. Die großen runden bis ovalen Zellen enthalten z. T. Vakuolen.

Agar NL 829: Alter: 4 Wochen
Es liegt ein Gemisch von filamentösen Hyphen und knotenstockähnlich verdickten Hyphenstücken mit zentralem Plasma vor. Blasig aufgetriebene, fast isodiametrische Zellen, die größtenteils vakuolisiert sind, sind ebenfalls zu beobachten.

Vorkultur NL 720: Alter 7 Tage

Kurze, 4 - 8zellige Hyphen, knotenstockartig verdickt, septiert, zentrales Plasma. Die Hyphen sind zum Teil blasig angeschwollen. Vereinzelt treten Hyphen mit wandständigem Plasma auf.

Hyphen-Ø: 7,5 - 12,5 μm ; Ø der blasigen Anschwellungen: 12,5 - 15 μm .

Hauptkultur NL 720: Alter 3 Tage

Kurze Hyphen aus 4 - 10 Segmenten, knotenstockartig verdickt, plasmareich.

Ø 7,5 - 13 μm ; Ø der blasigen Anschwellungen: 15 - 22,5 μm .

Alter: 7 Tage

Kurze Hyphenstücke aus 3 - 10 Segmenten, plasmareich, knotenstockartig verdickt, viele blasig angeschwollene Zellen.

Ø der Hyphen 10 - 13 μm ; Ø der blasigen Anschwellungen 15 - 18 μm .

Alter: 14 Tage

Kurze Hyphen aus 3 - 8 Segmenten. Die Zellen sind knotenstockartig verdickt, plasmareich und vereinzelt mit Vakuole.

Sehr viele große, runde bis ovale Zellen.

Zellgröße: 15 - 20 μm . Die Zellwände sind stark verdickt.

Die Kultivation erfolgt bei 24 ± 1 °C. Die Schüttelkulturen wurden auf Rundschütteltischen bei 240 UpM inkubiert.

Die aerobe Fermentation des Pilzes zur Produktion erfolgt zweckmäßigerweise in flüssigen Nährmedien in emerser und/oder submerser Kultur. Die Nährmedien enthalten eine assimilierbare C-Quelle, wie beispielsweise Saccharose, Glucose,

Mannit, Sorbit, Glycerin, Zitronen- oder Bernsteinsäure, eine assimilierbare N-Quelle, wie beispielsweise Ammoniak, Asparagin, Pepton, Caseinhydrolysat oder ein Ammoniumsalz sowie Mineralsalze. Die Fermentation kann beispielsweise in Fernbach-, Erlenmeyer- oder Schüttelkolben oder im Fermentor erfolgen.

Die Kultivation erfolgt im allgemeinen ein- bis dreistufig. Es ist vorteilhaft, wenn die Vorkultur 4 - 14 Tage alt und das Impfverhältnis Vorkultur : Hauptkultur 1 : 5 bis 1 : 20 ist. Die Hauptkultur beträgt 7 - 20 Tage. Der pH-Wert kann zwischen 4,0 und 6,2, die Temperatur zwischen 20 und 30 °C liegen. Besonders zweckmäßig ist eine Fermentation bei 22 - 25 °C und pH 5,2 - 5,9. Die Stammerhaltung kann auf übliche Weise erfolgen.

Der neue Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 180 ist beim Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR in Jena unter der Bezeichnung ZIMET PA 138 hinterlegt. Er bildet ein Gesamtalkaloidgemisch von 500 - 600 µg/ml Kulturlösung, von dem mindestens 90 % der Alkaloide in organische Lösungsmittel ausschüttelbar sind und aus ca. 80 % Chanoclavin-I und ca. 20 % Chanoclavin-I-aldehyd bestehen. Chanoclavin-I-aldehyd war bisher nur synthetisch zugänglich, er wird hier erstmals als Naturstoff isoliert. Die Alkaloide werden aus den Nährmedien auf an sich bekannte Weise gewonnen.

Gegebenenfalls wird zur Steigerung der Ausbeute an Chanoclavin-I der Chanoclavin-I-aldehyd auf einfache, an sich bekannte Weise zu Chanoclavin-I reduziert. Hierzu eignen sich z. B. komplexe Hydride wie NaBH_4 (siehe Beispiel 4).

Der neue Stamm zeichnet sich dadurch aus, daß nur eine kurze Fermentationsdauer erforderlich ist, daß er mehr als 95 % der gebildeten Alkaloide in das umgebende Nährmedium abgibt und daß keine aufwendige Abtrennung von Nebenalkaloiden erforderlich ist.

Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern. Die verwendeten Nährmedien sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Beispiel 1

Ausgehend von Konserven des Stammes *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 180 wurden Vorkulturen in 100 ml Medium NL 720 in 500 ml-Schüttelkolben beimpft. Die Kolben wurden 7 Tage bei 24 ± 1 °C bei 240 UpM bebrütet. 10 % der erhaltenen Kulturen dienten dazu, jeweils einen 500 ml-Schüttelkolben mit 100 ml Medium NL 720 zu beimpfen. Nach 14tägiger Bebrütung unter den genannten Bedingungen enthielten die angesetzten Hauptkulturen zwischen 450 und 550 µg Gesamtalkaloid pro ml Kulturfiltrat. 75 - 80 % des Alkaloides war Chanoclavin-I. Der Rest wurde als Chanoclavin-I-aldehyd identifiziert.

Beispiel 2

Ausgehend von den im Beispiel 1 genannten Vorkulturen wurden Hauptkulturen mit Medium NL 833 beimpft. Für 100 ml Medium wurden 10 ml Vorkultursuspension verwendet. Nach 14tägiger Inkubation bei 24 ± 1 °C und 240 UpM waren 500 - 600 µg Alkaloid pro ml gebildet. Das Spektrum entsprach dem in Beispiel 1 genannten.

Beispiel 3

Zur Identifizierung bzw. Isolierung der Alkaloide wurden entsprechende Mengen der Kulturlösung alkalisiert und dreimal mit Chloroform extrahiert. Bei Aufarbeitung der Gesamtsuspension oder des Mycels wurde mit Weinsäure (2 %) extrahiert (Ultra-Turrax), entfettet und das Alkaloid nach Alkalisierung ebenfalls in Chloroform aufgenommen. Nach dem Einengen im Vakuum wurde der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mittels präparativer Schichtchromatographie untersucht. Als Laufmittelsysteme kamen zum Einsatz:

- a) CHCl_3 /Methanol = 8 : 2
- b) Methanol (nur für die Trennung und Isolierung des Aldehyds)

Als Trennmateriel diente Kieselgel PF_{254} "Merck" in einer Schichtdicke von 1 mm.

Das isolierte Chanoclovin-I besaß nach Umkristallisation aus Aceton einen Schmelzpunkt von 215°C (Boetius-Heiztisch). Der spezifische Drehwert (gemessen in Pyridin bei $c = 1$, 20°C , D-Linie des Natriums) betrug -238° . Weitere Identifizierung erfolgte mittels IR-, NMR- und Massenspektren. Die vergleichende chromatographische Untersuchung (DC, Kieselgel PF_{254} "Merck", 0,7 mm Schichtdicke) ergab Übereinstimmung mit authentischem Vergleichsmaterial. Folgende R_F -Werte wurden bestimmt:

- 1. CHCl_3 : tert. Butanol = 3 : 1 (in 15 % Ammoniakatmosphäre) : 0,39
- 2. Methanol : 0,12
- 3. CHCl_3 : Methanol = 8 : 2 : 0,08

Im Massenspektrum des Chanoclavin-I waren u. a. folgende Peaks zu beobachten:

m/e 256, 1586 (ber. 256, 1576) $C_{16}H_{20}N_2O$, M^+ ; 237;
183,0935 (ber. 183,0922) $C_{12}H_{11}N_2$; 168; 167; 155; 154.

Das Kernresonanzspektrum enthielt unter anderem die Signale (δ -Werte in ppm, Lösungsmittel CD_3OD , HMDS als Standard):

1,85	Vinyl- CH_3	Singulett
2,42	N-Methyl	Singulett
3,85-3,95	H an C_{10}	Multipllett
4,13	$-CH_2O$ -Gruppe	Singulett
5,3-5,4	Vinyl-Wasserstoff	Dublett

(Zur Numerierung der einzelnen C-Atome vergleiche Abbildung 1).

Der amorphe Chanoclavin-I-aldehyd wurde zweimal über präparative DC unter den schon genannten Bedingungen gereinigt. Die Identifizierung erfolgte im Vergleich zu synthetischem Material (hergestellt nach Angaben von Naidoo et al., Chemical Communications 1970, 471-2) mittels DC; IR-, NMR- und Massenspektroskopie. Als R_F -Werte wurden ermittelt:

- | | |
|--------------------------------|--------|
| 1. $CHCl_3$: Methanol = 8 : 2 | : 0,44 |
| 2. Methanol | : 0,27 |

Mit van Urk's-Reagenz gibt der Aldehyd nach einigen Minuten eine Türkisfärbung.

Im IR-Spektrum tritt bei 1685 cm^{-1} die Aldehydbande auf (Lösungsmittel: $CHCl_3$).

Das NMR-Spektrum des Chanoclavin-I-aldehyds zeigte unter anderem folgende Signale (δ -Werte in ppm, Lösungsmittel

CD₃OD, HMDS als Standard):

1,95	Vinyl-CH ₃	Singulett
2,52	N-Methyl	Singulett.
4,33	H an C ₁₀	Multiplett
8,0	NH des Indolringes	Singulett
9,46	H des Aldehydes	Singulett

Zur Numerierung der einzelnen C-Atome vergleiche Abbildung 1).

Das Massenspektrum des Chanoclavin-I-aldehydes zeigte u. a. folgende Peaks:

m/e 254,1414 (ber. 254,1419) M⁺, C₁₆H₁₈N₂O; 237,1407 (ber. 237,1392), C₁₆H₁₇N₂; 223,1010 (223,0907), C₁₅H₁₃NO; 194,1017 (ber. 194,0970), C₁₄H₁₂N; 168; 155; 154.

Nach Deuterierung mit D₂O wurden 2 Wasserstoffatome ausgetauscht. Der Molekülpeak verschwand, dafür trat bei m/e 256 der neue M⁺-Peak auf. Daraus ist zu entnehmen, daß 2 Wasserstoffatome austauschbar sind.

Beispiel 4

400 - 500 mg Rohalkaloid wurden in 50 ml wässrigem Methanol gelöst. Dieser Mischung setzte man etwa 200 mg Natriumborhydrid zu und erwärmte für 30 Minuten auf 60 °C. Nach Ablauf dieser Reaktion war mit den in Beispiel 3 genannten chromatographischen Methoden kein Chanoclavin-I-aldehyd mehr nachweisbar, es war nur der Fleck des Chanoclavin-I zu sehen.

Tabelle 1:

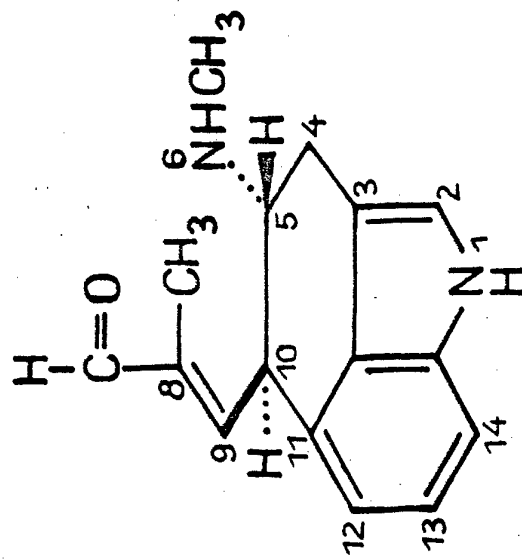
Zusammenstellung der verwendeten Nährlösungen
(Angaben in g/l)

	NL 720	NL 833	NL 126	NL 829
Saccharose	200,0	300,0	-	100,0
Bierwürze	-	-	150 ml	-
Ammoniumcitrat	15,0	20,0	1,0	-
Asparagin	-	-	-	10,0
Hefeextrakt	-	-	5,0	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,0	1,0	-	1,0
KH_2PO_4	0,25	0,25	-	0,25
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	-	-	5,0	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3	0,3	-	0,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,010	0,010	-	0,020
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,0308	0,0308	-	0,02
KCl	0,1	-	-	-
Aqua dest. ad	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Agar-Agar	-	-	30,0	30,0
pH vor dem Sterilisieren	5,8-6,0	5,4	6,0	5,4
pH-Einstellung mit	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH
Autoklavieren	jeweils einheitlich 30 min. bei 110 °C.			

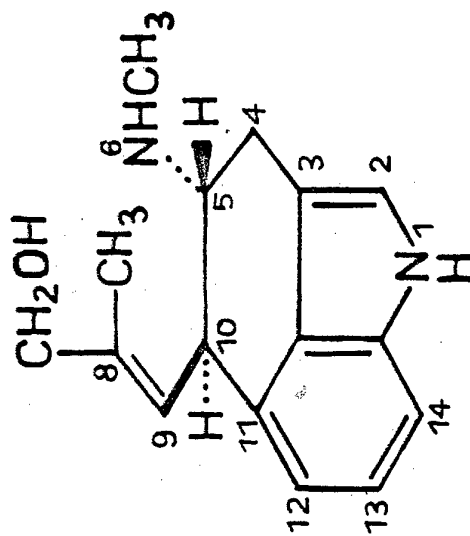
Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Chanoclavin-I, dadurch gekennzeichnet, daß der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 180, ZIMET PA 138, seine Mutanten oder Varianten verwendet werden, wobei die Ausbeute an Chanoclavin-I gegebenenfalls durch anschließende Reduktion des anfallenden Chanoclavin-I-aldehyds erhöht wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. 180, ZIMET PA 138, in aerober Fermentation in einem flüssigen Nährmedium, welches eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, eine assimilierbare Stickstoffquelle und Mineralsalze enthält, in emerser und/oder submerser Kultur bei einer Temperatur von 20 - 30 °C und einem pH-Wert von 4,0 - 5,2 während eines Zeitraumes von 7 - 35 Tagen kultiviert und das aus dem Nährmedium auf an sich bekannte Weise zu Chanoclavin-I-aldehyd und/oder Chanoclavin-I aufgearbeitet wird.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation bei 22 - 25 °C und pH 5,2 - 5,9 durchgeführt wird.
4. Verfahren nach den Punkten 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduktion des Chanoclavin-I-aldehyds im isolierten Rohalkaloid mit komplexen Hydriden durchgeführt wird.

Hierzu 1 Seite Formeln



CHANOCLAVIN - I - ALDEHYD



CHANOCLAVIN - I