



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

(19) DD (11) 234 172 A3

4(51) C 12 P 17/18

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 D / 217 235 0	(22)	16.07.79	(45)	26.03.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, 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.; Breuel, Klaus, Dr. Dipl.-Biol.; Höhne, Liselotte, DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von Ergotamin
------	---

(57) Es wird die Gewinnung des Alkaloids Ergotamin mit Hilfe des Stammes *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 74, IMET PA 135, seiner Mutanten oder Varianten beschrieben. Dieser neue Stamm bildet ein Gesamalkoloidgemisch von 900–1500 µg pro ml Kulturlösung, von dem mindestens 50% der Alkaloide mit organischen Lösungsmitteln ausschüttelbar sind. Neben dem Ergotamin bzw. seinem Isomeren Ergotaminin (zusammen mehr als 75–80% des ausschüttelbaren Alkaloidanteils) werden Chanoclavin (10–15%), Ergometrin (5–6%), Ergosin (Spuren – max. 4%), Ergokryptin (5%) und gegebenenfalls andere Clavine in Spuren gebildet. In dem Nährmedium befindet sich auch Lysergsäure. 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.

1. Verfahren zur Herstellung von Ergotamin, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 74, IMET PA 135, seine Mutanten oder Varianten verwendet werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 74, IMET PA 135, 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 und das gebildete Ergotamin/Ergotaminin aus dem Nährmedium auf an sich bekannte Weise isoliert 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.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Von den über 50 bisher bekannten natürlichen Mutterkornalkaloiden besitzen die Vertreter der Peptidgruppe eine große Bedeutung in der Medizin. Die bekanntesten Vertreter sind Ergotamin, Ergocornin, Ergokryptin und Ergocristin. Das Ergotamin bewirkt vor allem einen Anstieg des Blutdruckes, eine Verstärkung und Beschleunigung der Uteruskontraktion und eine Hemmung der adrenergischen Nervenfasern. Es wird in der Gynäkologie und inneren Medizin angewandt. Daneben besteht die Möglichkeit der partialsynthetischen Abwandlung, insbesondere zur Erschließung neuer Indikationen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Den Stand der Technik zur saprophytischen Ergotamingewinnung bestimmen heute drei Verfahren.

Der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. ATCC 15383 bildet 900–1450 µg Ergotamin pro ml Kultursuspension. Die Alkaloide (Ergotamin/Ergotaminin) sind bei diesem wie auch bei den anderen zu diskutierenden Verfahren sowohl in der Kulturlösung als auch im Mycel verteilt (BRD-AS 1210 128).

In einem anderen Verfahren wird mit Hilfe des Stammes *Claviceps purpurea* FI 32/17 ein Alkaloidgemisch aus Ergotamin und Ergokryptin bzw. deren Isomeren Ergotaminin und Ergokryptinin in Mengen von 1200–3800 µg Alkaloid pro ml Kultursuspension gebildet, wobei der Anteil der beiden Alkaloide Ergotamin und Ergokryptin etwa gleich hoch angegeben wird (BRD-OS 1792038).

Der Stamm *Claviceps purpurea* OKI 56/70 bildet in saprophytischer Kultur zwischen 1300 und 1850 µg Alkaloide pro ml Kultursuspension, von denen etwa 80% Ergotamin/Ergotaminin sind (Ungar. Pat. 161 654).

Alle Verfahren haben den Nachteil, daß zur Isolierung der Alkaloide die gesamte Kultursuspension aufgearbeitet werden muß. In der Notwendigkeit der Extraktion der Alkaloide sowohl aus dem Nährmedium als auch aus dem Mycel besteht ein technischer Nachteil dieser Verfahren. Ein weiterer Nachteil des zweiten der genannten Verfahren ist das Vorhandensein von zwei verwandten Peptidalkaloiden, dem Ergotamin und dem Ergokryptin, in gleichen Mengen, so daß aufwendige Trennverfahren eingeschaltet werden müssen.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, nach einem günstigen Verfahren das Alkaloid Ergotamin herzustellen und damit verstärkt der Verwendung in der Medizin zuzuführen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ergotamin zu entwickeln, bei dem die Isolierung des Alkaloids nur aus dem Nährmedium erfolgt und das die aufwendige Abtrennung verwandter Peptidalkaloide nicht erfordert.

Hierzu sind Stämme zu isolieren, die

1. in der Lage sind, saprophytisch Ergotamin zu bilden, das nahezu frei ist von Nebenalkaloiden der Peptidgruppe,
2. die gebildeten Alkaloide zu mehr als 95% in das umgebende Nährmedium ausscheiden und
3. sich durch Stabilität, gute Alkaloidproduktion und günstige Fermentationseigenschaften auszeichnen.

Erfindungsgemäß werden zur Herstellung von Ergotamin der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 74, seine Mutanten oder Varianten verwendet.

Der neue Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 74 ist beim Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR in Jena unter der Bezeichnung IMET PA 135 hinterlegt. Er bildet ein Gesamtalkaloidgemisch (ca. 900–1500 µg/ml Kulturlösung), von dem mindestens 50% der Alkaloide in organische Lösungsmittel ausschüttelbar sind und davon wiederum mehr als 75–80% durch das Isomerenpaar Ergotamin/Ergotaminin repräsentiert werden. Als Begleitalkaloide sind im Gemisch enthalten:

Chanoclavin	10–15% des ausschüttelbaren Anteils,
Ergometrin	5–6% des ausschüttelbaren Anteils,
Ergosin	Spur–4% des ausschüttelbaren Anteils,
Ergokryptin	5% des ausschüttelbaren Anteils,
andere Clavine	teilweise in Spuren.

In den Nährmedien verbleibt nach dem Ausschütteln u. a. auch Lysergsäure. Die Alkaloide lassen sich auf bekannten Wegen aus dem Nährmedium isolieren. Eine Umwandlung der isomeren Alkaloide ineinander ist möglich.

Der neue Stamm zeichnet sich dadurch aus, daß er mehr als 95% der gebildeten Alkaloide in die umgebenden Nährmedien abgibt und daß die Begleitalkaloide relativ leicht abtrennbar sind.

Die Kultivation zur Charakterisierung von *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 74, IMET PA 135, 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: 3 Wochen

Agar NL 126: Flacher, hellbrauner Rasen, feinwollig, braun, gefaltet.

Einzelkolonien: Ø 0,8–1,3 cm, scharf aufgesetzt, hellbraun, feinwollig.

Schwache Fluoreszenz im UV-Licht.

Agar NL 829: Rasen erhaben, stark gefaltet, Oberseite graubraun, scharf aufgesetzter Rand.

Einzelkolonien: Ø 0,8–1,3 cm, Höhe bis 1 cm. Napfkuchenförmig, scharf aufgesetzt. Oberseite graubraun, Unterseite: junge Kolonien gelbbraun, alte Kolonien mittelbraun. Fluoreszenz im UV-Licht.

Mikroskopisches Aussehen:

Vorkultur NL 849:

3 Tage alt — relativ kurze, stark verzweigte Hyphen. Die Hyphen sind mehr oder weniger deutlich septiert, stark gekörnelt, mit leicht knotenstockartigen Verdickungen, vereinzelt Arthrosporen. Länge der Hyphen 50–200 μm , blasige Verdickungen 10 μm .

Hauptkultur NL 833:

7 Tage alt — Mycel mit langen verzweigten Hyphen. Hyphenwand normal, nicht besonders auffällig, septiert. Hyphen „körnig“, Plasma zentral oder wandständig. Blasige Anschwellungen, meist am Hyphenende. Vereinzelt Sporen (Chlamydo- oder Arthrosporen), Hyphen- $\varnothing$ 5–7 μm , $\varnothing$ der blasigen Anschwellungen: 8–10 μm .

14 Tage alt — Mycel mit langen verzweigten Hyphen, stark septiert. Plasma zentral oder wandständig. Hyphen- $\varnothing$ 5–7 μm . Knotenstockartige Verdickungen 8–12 μm . Vereinzelt Arthrosporen.

Das Mycel enthält Lipidtröpfchen, deren Anteil in alkaloidproduzierenden Kulturen besonders hoch ist.

Die Kultivation erfolgte bei $24 \pm 1^\circ\text{C}$. 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 Fermenter erfolgen.

Die Kultivation erfolgt zweckmäßigerweise ein- bis dreistufig. Es ist vorteilhaft, wenn die Vorkultur 4–14 Tage alt und das Impfverhältnis Vor-: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.

Optimal ist eine Fermentation bei $22\text{--}25^\circ\text{C}$ und pH 5,2–5,9.

Die Stammerhaltung kann über Röhrchen, Protoplastenkultivation oder durch Tiefkühlagerung unter Verwendung von Schutzkolloiden, wie z. B. 60%ige Saccharoselösung:Magermilch 2:1, auf übliche Weise erfolgen.

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 74 wurden Vorkulturen von 100 ml Medium NL 849 in 500-ml-Schüttelkolben beimpft. Die Kolben wurden 7 Tage bei $24 \pm 1^\circ\text{C}$ bei 240 UpM bebrütet. 10% der erhaltenen Kulturen dienten dazu, 500-ml-Kolben mit je 100 ml Medium NL 833 zu beimpfen. Nach 14-tägiger Bebrütung unter den beschriebenen Bedingungen enthielten die Kulturen 1450 $\mu\text{g/ml}$ Kulturlösung Alkaloid der oben genannten Zusammensetzung.

Beispiel 2:

Ausgehend von der im Beispiel 1 genannten Vorkultur in NL 849 wurden zwei Vorkulturen im gleichen Medium angesetzt. Das Impfverhältnis betrug auch diesmal 1:10. Nachdem durch 7-tägige Kultur das Impfmateriel angezogen war, wurde es zur Beimpfung eines Fermenters mit 2,0 l NL 833 im Verhältnis 1:10 mit diesen zweiten Vorkulturen beimpft.

Temperatur: 24°C

Rührgeschwindigkeit: 280–450 UpM, variiert nach Zuwachsrate

Luftstrom: 0,2–0,65 l/min, je nach Dichte des gewachsenen Mycels.

Nach 12 Tagen waren 900 μg Gesamtalkaloid/ml Kulturlösung gebildet.

Beispiel 3:

Zur Identifizierung der Alkaloide wurden 1–5 ml der Nährmedien alkalisiert und dreimal mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird zur Trockne gebracht, in wenig Chloroform aufgenommen und durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel mit Fluoreszenzindikator getrennt. Als Lösungsmittelsystem wird Chloroform:Äthanol (9:1) verwendet. Die Alkaloidzonen werden von der Platte abgetrennt, mit einer Mischung von Wasser:Methanol:Eisessig (45:45:10) aufgenommen, im Verhältnis 2:4 mit van Urk's Reagenz versetzt, unter einer Quarzlampe 5 Minuten bestrahlt, zentrifugiert und die Extinktion im Photometer bestimmt. Die Alkaloidmengen können Eichkurven entnommen werden. Von Parallelproben der präparativen Schichtchromatographie können die dem Ergotamin bzw. Ergotaminin zuzuordnenden Zonen getrennt eluiert und der Identifizierung zugeführt werden. Besonders geeignet sind: Massenspektrometrie (m/e : 581 (M^+), 314, 296, 286, 271, 267, 244, 223, 221, 215, 180, 167, 153, 131, 125), UV-, IR-, NMR-Spektroskopie, chromatographische Methoden sowie saure Hydrolyse und Nachweis der charakteristischen Aminosäuren Prolin und Phenylalanin. Bei alkalischer Hydrolyse ist Lysergsäure (aus Ergotamin) bzw. Isolysergsäure (aus Ergotaminin) nachweisbar.

Tabelle 1

Zusammenstellung der verwendeten Nährlösungen (Angaben in g/l).

	NL 849	NL 720	NL 833	NL 126	NL 829
Saccharose	300,0	200,0	300,0	—	100,0
Magermilch	100 ml	—	—	—	—
Bierwürze	—	—	—	150 ml	—
Ammoniumcitrat	10,0	15,0	20,0	1,0	—
Asparagin	—	—	—	—	10,0
Hefeextrakt	—	—	—	5,0	0,5
Ca(NO ₃) ₂	—	1,0	1,0	—	1,0
KH ₂ PO ₄	0,25	0,25	0,25	—	0,25
(NH ₄) ₂ HPO ₄	—	—	—	5,0	—
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3	0,3	0,3	—	0,25
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	—	0,010	0,010	—	0,020
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	—	0,0308	0,0308	—	0,02
KCl	—	0,1	—	—	—
Aqua dest. ad	1 000,0	1 000,0	1 000,0	1 000,0	1 000,0
Agar-Agar	—	—	—	30,0	30,0
pH vor dem Sterilisieren	5,4	5,8–6,0	5,4	6,0	5,4
pH-Einstellung mit	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH
Autoklavieren	Jeweils einheitlich 30 min bei 110 °C.				