



PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 289 518 1	(22)	23.04.86	(44)	25.07.90
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD				
(72)	Schumann, Brigitte, Dr. Dipl.-Biol.; Gröger, Detlef, Prof. Dr. sc.; Schmauder, Hans-Peter, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Lehmann, Hans-Rudolf, Dipl.-Chem.; Maier, Walter, Dr. Dipl.-Chem., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung von alpha-Ergokryptin und Ergosin				

(57) Um alpha-Ergokryptin und Ergosin in ausreichenden Mengen für die Therapie und für partialsynthetische Arbeiten zur Verfügung zu stellen, wurde die Aufgabe gestellt, diese Alkaloide durch saprophytische Kultur eines Pilzstammes zu produzieren. Die Aufgabe wurde gelöst, indem man zur Herstellung von alpha-Ergokryptin und Ergosin den Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 84, ZIMET 43 768, oder eine seiner Mutanten oder Varianten einsetzt. Der Stamm wird in aerober submerser Fermentation unter Verwendung von Nährmedien, die assimilierbare Kohlenstoff-, assimilierbare Stickstoffquellen und Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur von 20–30°C und einem pH-Wert von 4,0–6,4 kultiviert. Der Stamm bildet nach 7–14 Tagen Hauptkultur ein Gesamtalkaloidgemisch von 700–1400 µg/ml Kultursuspension, von denen 200–400 µg/ml Kultursuspension Cyclolalkaloide sind. Mindestens 90% der Alkaloide sind aus dem Kulturfiltrat isolierbar. Die erhaltenen Cyclolalkaloide sind alpha-Ergokryptin/alpha-Ergokryptinin (80%) und Ergosin/Ergosinin (20%). Das Verhältnis ist durch Zufütterung der für den jeweiligen Cyclolteil spezifischen Aminosäure, Valin oder Alanin, steuerbar.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von alpha-Ergokryptin und Ergosin, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 84, ZIMET 43768, oder eine seiner Mutanten oder Varianten verwendet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 84, ZIMET 43768, in aerober, submerser Kultur in einem Nährmedium, das mindestens eine assimilierbare Kohlenstoffquelle, eine assimilierbare Stickstoffquelle und Mineralsalze enthält, bei einer Temperatur von 20–30°C und einem pH-Wert zwischen 4,0 und 6,4 während eines Hauptkultur-Zeitraumes von 7–14 Tagen fermentiert und die gebildeten Cyclolalkaloide alpha-Ergokryptin/alpha-Ergokryptinin und Ergosin/Ergosinin auf an sich bekannte Weise aus der Kultursuspension isoliert.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Fermentation bei 22–25°C und bei pH 5,2–5,9 durchführt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Verhältnis der hergestellten Cyclolalkaloide durch Zufütterung von cyclolteilspezifischen Aminosäuren in Mengen bis zu 6 g/l Kultursuspension steuert.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Verhältnis der hergestellten Cyclolalkaloide alpha-Ergokryptin und Ergosin durch Zufütterung von L-Valin zugunsten des alpha-Ergokryptins steuert.
6. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Verhältnis der hergestellten Cyclolalkaloide alpha-Ergokryptin und Ergosin durch Zufütterung von L-Alanin zugunsten des Ergosins steuert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Von den mehr als 50 bisher in der Natur gefundenen Mutterkornalkaloiden besitzen die Alkaloide, bei denen an der Lysergsäure Cyclolstrukturen amidartig gebunden sind, die bisher größte Bedeutung in der Medizin. Zu den Vertretern dieser Gruppe gehört auch das alpha-Ergokryptin, dessen Cyclolteil von den Aminosäuren L-Prolin, L-Leucin und L-Valin gebildet wird, sowie das Ergosin, bei dem sich der Cyclolteil aus den Aminosäuren L-Alanin, L-Leucin und L-Prolin zusammensetzt. Beide Alkaloide sind von therapeutischem Interesse, wobei das alpha-Ergokryptin vor allem in seiner Dihydroform in verschiedenen Arzneimitteln enthalten ist. Alpha-Ergokryptin und Ergosin werden auch als Ausgangsprodukt für Partialsynthesen anderer medizinisch wertvoller Wirkstoffe, wie beispielsweise 2-Brom-alpha-ergokryptin und 2-Bromergosin eingesetzt.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Alpha-Ergokryptin ist Bestandteil des Alkaloidgemisches, das von einer Reihe von parasitisch wachsenden Stämmen der Art *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. gebildet wird. Saprophytisch alpha-Ergokryptin bildende Stämme sind bisher nur wenige bekannt. Ein Stamm, der Ergokryptin bildet, ist von italienischen Autoren beschrieben worden (z. B. CH-Patent 485020). Er bildet 1100–1500 mg Ergokryptin/l Kultursuspension. Angaben über das Verhältnis der beiden Isomeren alpha- und beta-Ergokryptin zueinander fehlen.

Einen Stamm mit der Fähigkeit, ein Gemisch aus Ergotamin und Ergokryptin zu bilden, beschreiben ebenfalls italienische Autoren (z. B. CH-Patent 489606). Ergotamin und Ergokryptin sind zu etwa gleichen Teilen in dem Alkaloidgemisch enthalten. Für die Alkaloidausbeuten sind bis zu 3800 mg/l Kultursuspension angegeben. Das gebildete Ergokryptin ist eine Mischung der beiden Isomeren alpha- und beta-Ergokryptin.

Ungarische Autoren beschreiben zwei Verfahren, bei denen neben Ergometrin und Ergocornin bzw. neben Ergocornin Ergokryptin mit Anteilen von nur 20 bzw. 30 % gebildet wird (z. B. HU-Patent 150631, DD-Patentschrift 105460). Auch hier ist nicht angegeben, welchen Anteil am Ergokryptingemisch das alpha-Ergokryptin hat.

Durch Zufütterung der Vorstufen-Aminosäure L-Leucin in Mengen von mehr als 2–3 g/l Suspension ist es möglich, die Anteile an alpha-Ergokryptin zu ungunsten des beta-Ergokryptins und teilweise auch der anderen Cyclolalkaloide zu erhöhen (siehe z. B. CS-Urheberschein 202613; H. Kobel und J. J. Sanglier bzw. C. Spalla und M. P. Marnati in: „Antibiotics and other secondary metabolites, biosynthesis and production“, eds.: R. Hütter, T. Leisinger, J. Nüesch, W. Wehrli, Academic Press 1978, pp. 233–242. bzw. pp. 219–232; M. L. Bianchi et al., in: „Overproduction of microbial products“, eds. V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek, Academic Press 1982, pp. 235–242).

Alle bisher genannten Verfahren besitzen den Nachteil, daß neben dem gewünschten alpha-Ergokryptin weitere schwer abtrennbare Cyclolalkaloide der Ergotoxingruppe, wie beispielsweise beta-Ergokryptin und Ergocornin gebildet werden, deren Anteil höher als 15–20 % liegt. Dies erfordert einen verhältnismäßig hohen Aufwand bei der Isolierung und Reinigung des alpha-Ergokryptins.

Zur Herstellung von Ergosin sind folgende saprophytische Verfahren bekannt:

In einem britischen Patent ist beschrieben, daß durch *Claviceps purpurea* OK188/72 neben Ergokryptin, Ergocornin und Ergometrin als Hauptalkaloide (30 %, 28 % bzw. 22 %) auch Ergosin in Mengen von 5 % gebildet wird (Brit. Patent 1401406).

In anderen Patenten wird die gleichzeitige Gewinnung von Ergocornin und Ergosin nebeneinander geschützt. Der geschützte Stamm bildet beide Alkaloide bzw. ihre Isomeren Ergocorninin und Ergosinin in etwa gleichen Mengen bei einem Gesamtalkaloidgehalt von etwa 900–1 100 µg/ml Nährlösung (Brit. Patent 1 184 039).

In zwei weiteren Patenten ist die mikrobiologische Gewinnung eines von anderen Cyclolalkaloiden freien Ergosins beschrieben. Als Begleitalkaloide treten Clavinalkaloide auf (etwa 10% der Gesamtalkaloide gegenüber 90% Ergosin/Ergosinin), die leicht abtrennbar sind (DD-Patentschriften 129 801 und 151 964).

Da Ergosin im Verhältnis zum alpha-Ergokryptin nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen muß, wäre es zweckmäßig, dieses Alkaloid mit Hilfe eines Stammes herzustellen, der das in großem Umfang benötigte alpha-Ergokryptin als Hauptalkaloid und Ergosin als Nebenalkaloid bildet, denn die erforderlichen kleineren Mengen an Ergosin rechtfertigen ökonomisch nicht die Gewinnung durch zusätzliche Fermentation eines speziellen Ergosin-Stammes. Ein Stamm, der alpha-Ergokryptin und Ergosin als einzige Cyclolalkaloide produziert, ist jedoch bisher noch nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, die therapeutisch wichtigen Alkaloide alpha-Ergokryptin und Ergosin ökonomisch vorteilhaft zu produzieren, um sie für die medizinische Praxis sowie für Partialsynthesen in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren zu entwickeln, nach dem durch saprophytische Kultivation eines Pilzstammes gleichzeitig alpha-Ergokryptin und Ergosin herstellbar sind, wobei das Verfahren durch folgende Parameter charakterisiert sein soll:

1. alpha-Ergokryptin und Ergosin sind die einzigen produzierten Cyclolalkaloide.
2. Das Mengenverhältnis dieser Alkaloide beträgt bei einer Fermentation ohne spezifische Aminosäurezusätze durchschnittlich 80:20.
3. Dieses Verhältnis ist zugunsten des alpha-Ergokryptins oder des Ergosins steuerbar.

Erfindungsgemäß wird zur Herstellung von alpha-Ergokryptin und Ergosin der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 84 oder eine seiner Mutanten oder Varianten verwendet.

Der Stamm *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 84 ist beim Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR in Jena unter der Bezeichnung ZIMET 43 768 hinterlegt. Er wächst auf bzw. in Medien, die assimilierbare C- und N-Quellen sowie Mineralsalze enthalten.

Die Kultivation zur Charakterisierung von *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP 84, ZIMET 43 768, erfolgt beispielsweise auf bzw. in den in Tabelle 1 zusammengestellten Medien. Der Stamm besitzt die folgenden makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften:

Makroskopisches Aussehen:

Alter der Kulturen: 4 Wochen

Agarmedium: NL 868

Rasen erhaben, meist gekräuselt, hellgrau bis grauviolett Einzelkolonien klein bis mittelgroß, etwa 5 mm hoch, scharf aufgesetzt, rund und napfkuchenförmig, hell bis hellbraun. Fluoreszenz im UV-Licht.

Der Stamm bildet auf festen Medien keine Sektoren, da er homokaryotisch ist.

Mikroskopisches Aussehen:

Vorkultur NL 849, 7 Tage alt:

Lange, verzweigte Hyphen, septiert, Plasma gekörnelt, zentral oder wandständig.

Durchmesser der Hyphen: 4–7 µm.

Hauptkultur NL 833, 7 Tage alt:

Mycel mit langen, verzweigten Hyphen. Die Hyphen sind septiert, erscheinen körnig und haben zentral- oder wandständiges Plasma. Am Hyphenende treten gelegentlich blasige Anschwellungen auf. Durchmesser der Hyphen 5–7 µm, der blasigen Anschwellungen 8–10 µm.

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

Die Alkaloidsynthese erfolgt z. B. in aerober, submerser Kultur. Nach 7–14 Tagen bildet der Stamm 700–1 400 µg Gesamtalkaloidgemisch/ml Kultursuspension, von denen 200–400 µg/ml Suspension Cycloalkaloide sind. Das alpha-Ergokryptin sowie dessen Strukturisomeres alpha-Ergokryptinin repräsentieren hierbei mindestens 80% des Cyclolalkaloidanteiles. Als weiteres Alkaloid der Cyclolgruppe wird nur Ergosin/Ergosinin gebildet.

Die Nährmedien enthalten eine oder mehrere assimilierbare C-Quellen, wie beispielsweise Saccharose, Glucose, Mannit, Sorbit, Glycerin, Zitronensäure, eine oder mehrere assimilierbare N-Quellen, wie beispielsweise Ammoniak, Asparagin, Pepton, Caseinhydrolysat, Harnstoff oder ein Ammoniumsalz, sowie Mineralsalze. Die Fermentation kann beispielsweise in Schüttelkolben oder in Fermentoren durchgeführt werden. Diese erfolgt ein- bis vierstufig, wobei es vorteilhaft ist, wenn die Vorkultur 5–8 Tage als und das Impfverhältnis Vorkultur:Hauptkultur 1:5 bis 1:20 ist. Die Hauptkultur zur Alkaloidproduktion dauert 7–14 Tage. Der pH-Wert kann zwischen 4,0 und 6,4, die Temperatur zwischen 20 und 30°C liegen. Optimal ist eine Fermentation bei 22–25°C und pH 5,2–5,9.

Durch Zufütterung der cyclolteilspezifischen Aminosäuren Valin bzw. Alanin kann man das Verhältnis der beiden Cyclolalkaloide alpha-Ergokryptin und Ergosin zueinander zugunsten des jeweils bevorzugt benötigten Cyclolalkaloids steuern. So kann man beispielsweise durch Fütterung von L-Valin die Bildung von Ergosin zugunsten des alpha-Ergokryptins nahezu vollständig unterdrücken. Die Steuerung zugunsten des Ergosins erfolgt durch Fütterung von L-Alanin. Im allgemeinen verwendet man zur Steuerung nicht mehr als 6 g der Aminosäure/l Kultursuspension.

Isolation und Reinigung des alpha-Ergokryptin/alpha-Ergokryptinins sowie des Ergosin/Ergosinins erfolgen auf den an sich bekannten Wegen, wobei mindestens 90% der Alkaloide aus dem Kulturfiltrat isolierbar sind.

Dadurch, daß aus der Gruppe der Ergotoxine nur ein Alkaloid, das alpha-Ergokryptin, im Cyclolalkaloidgemisch enthalten ist, sind keine komplizierten Trennungen notwendig. Das alpha-Ergokryptin und das Ergosin bzw. deren Isomeren sind auf bekannten Wegen, z. B. durch Chromatographie, voneinander trennbar.

Die bei der Aufarbeitung anfallenden isomeren Alkaloide alpha-Ergokryptin und alpha-Ergokryptinin bzw. Ergosin und Ergosinin können auf übliche einfache Weise ineinander überführt werden.

Die Stammhaltung ist über Schrägagarkulturen, durch Tiefkühlagerung unter Verwendung an sich bekannter Schutzkolloide oder durch lyophilisierte Konserven auf übliche Weise möglich.

Das neue Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß in einer Fermentationszeit von 7–14 Tagen ein Alkaloidgemisch gebildet wird, das an Cyclolalkaloiden nur alpha-Ergokryptin und Ergosin (sowie deren Isomeren alpha-Ergokryptinin und Ergosinin) in einem Mengenverhältnis von durchschnittlich 80:20 enthält, wobei mindestens 90% der Alkaloide in das Kulturfiltrat ausgeschieden werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß dieses Mengenverhältnis der gebildeten Cyclolalkaloide durch Zufütterung der cyclolteilspezifischen Aminosäuren L-Valin oder L-Alanin steuerbar ist. Der Stamm ist, wie auch seine Varianten und Mutanten, gekennzeichnet durch Stabilität, ein homokaryotisches Mycel und gute Fermentationseigenschaften.

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

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Ausgehend von einer Gefrierkonserve des Stammes *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IBP84, ZIMET 43768, werden Vorkulturen in 500 ml-Stehrundkolben mit 100 ml NL849 beimpft. Nach 7 Tagen Inkubation auf einem Rundschwingtisch (240 Upm) dienen sie zum Beimpfen von Hauptkulturen mit 100 ml NL833 in 500 ml-Stehrundkolben (Impfverhältnis 1:10).

Nach 10-tägiger Inkubation unter den gleichen Bedingungen enthalten die Kulturen 1044 µg Gesamtalkaloidgemisch/ml Suspension, von denen 305 µg Cyclolalkaloide sind. Die Cyclolfraction enthält alpha-Ergokryptin als Hauptalkaloid neben Ergosin.

Beispiel 2:

Vorkulturen vom Beispiel 1 werden im Verhältnis 1:10 in jeweils 100 ml NL833H überimpft. Nach 12 Tagen Inkubation (s. Beispiel 1) enthalten diese Kulturen 773 µg Gesamtalkaloidgemisch/ml, von denen 213 µg/ml Cyclolalkaloide sind mit 85% alpha-Ergokryptin als Hauptalkaloid und 15% Ergosin.

Beispiel 3:

5 Vorkulturen von Beispiel 1 dienen als Impfmateriel für 5 l Medium NL833 in einem Laborfermentor. Nach 12-tägiger Fermentation bei 23°C und bei einer Durchmischungsrate von 300–500 Upm sowie einer Belüftungsrate von 1,4–7 vvm enthält die Suspension

812 µg Gesamtalkaloide/ml bzw.
225 µg Cyclolalkaloide mit 90% alpha-Ergokryptin und 10% Ergosin.

Beispiel 4:

Ein nach den Angaben des Beispiels 3 kultivierter Fermentor mit 5 l NL833H enthält nach 10 Tagen Fermentation in der Suspension 708 µg Gesamtalkaloide/ml bzw., 210 µg Cyclolalkaloide mit 84% alpha-Ergokryptin und 16% Ergosin.

Beispiel 5:

Vorkulturen vom Beispiel 1 werden im Verhältnis 1:10 in jeweils 100 ml NL833 in 500 ml-Stehrundkolben übertragen. Parallel zu unbehandelten Kontrollkolben werden einzelne Kolben mit 2, 3, 4 und 6 g L-Valin/l Medium bzw. mit 3 g L-Alanin/l Medium gefüttert. Nach 12 Tagen Inkubation (s. Beispiel 1) können folgende Werte ermittelt werden:

	Gesamt- alkaloide (µg/ml)	Cyclol- alkaloide (µg/ml)	% alpha-Ergo- kryptin im Cyclolalkaloidgemisch	% Er- gosin
Kontrolle	1067	380	80	20
Zusatz von 2 g/l L-Valin	1012	384	92	8
Zusatz von 3 g/l L-Valin	979	394	94,5	5,5
Zusatz von 5 g/l L-Valin	862	227	100	0
Zusatz von 3 g/l L-Alanin	1034	272	73,3	26,7

Beispiel 6:

Zur Identifizierung der Cyclolalkaloide alpha-Ergokryptin und Ergosin wird die Kultursuspension mit Ammoniaklösung alkalisiert und die Mischung mehrmals mit Chloroform homogenisiert. Die organischen Phasen werden gesammelt, getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt.

Nach dem Aufnehmen eines aliquoten Teiles des Rückstandes mit 0,5%iger Weinsäure wird die Mischung über eine kurze (0,5 cm × 2 cm) MN-Cellulose-Säule filtriert und das Filtrat unter folgenden Bedingungen einer HPLC-Untersuchung unterworfen.

Bedingungen: Säule vom Typ Si 100 Polyol RPS (Serva, 4,6 mm × 250 mm);

Fließmittel: Methanol:Wasser:Triethylamin = 60:40:1; Detektion bei 312 nm.

Durch Zumischen von reinem alpha-Ergokryptin bzw. Ergosin werden die Peaks identifiziert. Durch Berechnung der Peakflächen ist eine quantitative Bestimmung der Einzelkomponenten möglich. Zur Eichung dienen Reinstalkaloide.

Ein weiterer Teil des zur Trockne eingeeengten Extraktes wird einer DC-Kontrolle nach Rochelmeyer unterworfen.

Trägermaterial: Kieselgel PF₂₅₄ „Merck“ Schichtdicke 0,7 mm

Laufmittel: CHCl₃:C₂H₅OH = 9:1

Nachweis auf der Platte: UV-Löschung

Die entsprechenden Zonen werden von der Platte abgekratzt und mit van Urk-Reagenz angefärbt. Nach UV-Bestrahlung und Abzentrifugation des Kieselgels wird in einem Fotometer bei 570 nm die Extinktion bestimmt und durch Vergleich mit einer Eichkurve der Alkaloidgehalt ermittelt.

Tabelle 1

Zusammensetzung der verwendeten Nährlösungen (Angaben in g/l)

	NL 849	NL 833	NL 868	NL 833 H
Saccharose	300,0	300,0	100,0	300,0
Magermilch ¹⁾	100 ml	—	100 ml	—
Ammoniumcitrat	10,0	20,0	10,0	—
Harnstoff	—	—	—	5,0
Ca(NO ₃) ₂	—	1,0	—	1,0
KH ₂ PO ₄	0,25	0,25	0,25	0,25
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3	0,3	0,3	0,3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	—	0,010	—	0,010
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	—	0,0308	—	0,0308
Agar	—	—	30,0	—
Aqua dest. ad	1 000,0	1 000,0	1 000,0	1 000,0
pH vor dem				
Sterilisieren	5,4	5,4	5,5	5,4
pH-Einstellung mit	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH

Sterilisation jeweils einheitlich 30 min bei 110°C

¹⁾ Die Milch muß getrennt sterilisiert werden.