

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b><br><b>C07C 59/60, C12P 7/40, A61K 31/19</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>A1</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/24751</b><br><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 11. Juni 1998 (11.06.98)                                                                                                                                                                                                     |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP97/06735<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 2. Dezember 1997 (02.12.97)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>196 49 869,4      2. Dezember 1996 (02.12.96)      DE<br><br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b><br>GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).<br><br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). BÖHLENDORF, Bettina [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). HERRMANN, Martina [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). IRSCHIK, Herbert [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).<br><br><b>(74) Anwälte:</b> BOETERS, Hans usw.; Boeters & Bauer, Berateranger 15, D-81541 München (DE).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i><br><i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |
| <b>(54) Title:</b> UNSATURATED ALIPHATIC CARBOXYLIC ACIDS (MARACENINES), METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND AGENT AGAINST BACTERIA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>(54) Bezeichnung:</b> UNGESÄTTIGTE ALIPHATISCHE CARBONSÄUREN (MARACENINE), HERSTELLUNGSVERFAHREN UND MITTEL GEGEN BAKTERIEN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| $  \begin{array}{c}  20 \\  \text{CH}_x \text{---} \text{CH}_y \text{---} \text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_z \text{---} \text{CR}-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2- \\  1 \\  \text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H} \quad (I)  \end{array}  $                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>(57) Abstract</b><br><br>The invention relates to unsaturated aliphatic carboxylic acids (maracenines) of general formula (I), wherein, if x = 2, y = 1 and (a) means a double bond, z = 0, R is missing and (b) is a triple bond or z = 1, R is a C1 atom and (b) is a double bond or if x = 3, y = 2 and (a) is a single bond, z = 0, R is missing and (b) is a triple bond or z = 1, R is a C1 atom and (b) is a double bond. Another embodiment of the invention relates to an agent against bacteria, in particular against mycobacteria and for Nocardia, containing an amount of an unsaturated aliphatic carboxylic acid according to the invention (maracene) in addition to the usual auxiliary or carrier substances. The agent according to the invention can be intended for the treatment of tuberculosis.<br><br><b>(57) Zusammenfassung</b><br><br>Die Erfindung betrifft ungesättigte aliphatische Carbonsäuren (Maracene) der allgemeinen Formel (I), wobei, wenn x = 2, y = 1 und (a) eine Doppelbindung, z = 0, R fehlt und (b) eine Dreifachbindung oder z = 1, R ein C1-Atom und (b) eine Doppelbindung ist oder wenn x = 3, y = 2 und (a) eine Einfachbindung, z = 0, R fehlt und (b) eine Dreifachbindung oder z = 1, R ein C1-Atom und (b) eine Doppelbindung ist. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Mittel gegen Bakterien, insbesondere Mykobakterien und/oder Nocardien, mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen ungesättigten aliphatischen Carbonsäure (Maracene) neben üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen. Das erfindungsgemäße Mittel kann zur Tuberkulosebehandlung vorgesehen werden. |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

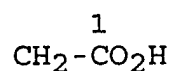
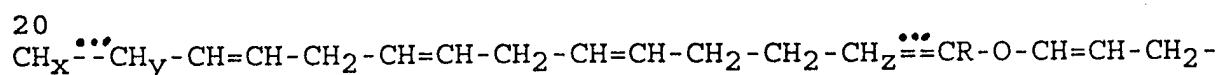
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|           |                              |           |                                      |           |                                                    |           |                                   |
|-----------|------------------------------|-----------|--------------------------------------|-----------|----------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------|
| <b>AL</b> | Albanien                     | <b>ES</b> | Spanien                              | <b>LS</b> | Lesotho                                            | <b>SI</b> | Slowenien                         |
| <b>AM</b> | Armenien                     | <b>FI</b> | Finnland                             | <b>LT</b> | Litauen                                            | <b>SK</b> | Slowakei                          |
| <b>AT</b> | Österreich                   | <b>FR</b> | Frankreich                           | <b>LU</b> | Luxemburg                                          | <b>SN</b> | Senegal                           |
| <b>AU</b> | Australien                   | <b>GA</b> | Gabun                                | <b>LV</b> | Lettland                                           | <b>SZ</b> | Swasiland                         |
| <b>AZ</b> | Aserbaidshan                 | <b>GB</b> | Vereinigtes Königreich               | <b>MC</b> | Monaco                                             | <b>TD</b> | Tschad                            |
| <b>BA</b> | Bosnien-Herzegowina          | <b>GE</b> | Georgien                             | <b>MD</b> | Republik Moldau                                    | <b>TG</b> | Togo                              |
| <b>BB</b> | Barbados                     | <b>GH</b> | Ghana                                | <b>MG</b> | Madagaskar                                         | <b>TJ</b> | Tadschikistan                     |
| <b>BE</b> | Belgien                      | <b>GN</b> | Guinea                               | <b>MK</b> | Die ehemalige jugoslawische<br>Republik Mazedonien | <b>TM</b> | Turkmenistan                      |
| <b>BF</b> | Burkina Faso                 | <b>GR</b> | Griechenland                         | <b>ML</b> | Mali                                               | <b>TR</b> | Türkei                            |
| <b>BG</b> | Bulgarien                    | <b>HU</b> | Ungarn                               | <b>MN</b> | Mongolei                                           | <b>TT</b> | Trinidad und Tobago               |
| <b>BJ</b> | Benin                        | <b>IE</b> | Irland                               | <b>MR</b> | Mauretanien                                        | <b>UA</b> | Ukraine                           |
| <b>BR</b> | Brasilien                    | <b>IL</b> | Israel                               | <b>MW</b> | Malawi                                             | <b>UG</b> | Uganda                            |
| <b>BY</b> | Belarus                      | <b>IS</b> | Island                               | <b>MX</b> | Mexiko                                             | <b>US</b> | Vereinigte Staaten von<br>Amerika |
| <b>CA</b> | Kanada                       | <b>IT</b> | Italien                              | <b>NE</b> | Niger                                              | <b>UZ</b> | Usbekistan                        |
| <b>CF</b> | Zentralafrikanische Republik | <b>JP</b> | Japan                                | <b>NL</b> | Niederlande                                        | <b>VN</b> | Vietnam                           |
| <b>CG</b> | Kongo                        | <b>KE</b> | Kenia                                | <b>NO</b> | Norwegen                                           | <b>YU</b> | Jugoslawien                       |
| <b>CH</b> | Schweiz                      | <b>KG</b> | Kirgisistan                          | <b>NZ</b> | Neuseeland                                         | <b>ZW</b> | Zimbabwe                          |
| <b>CI</b> | Côte d'Ivoire                | <b>KP</b> | Demokratische Volksrepublik<br>Korea | <b>PL</b> | Polen                                              |           |                                   |
| <b>CM</b> | Kamerun                      | <b>KR</b> | Republik Korea                       | <b>PT</b> | Portugal                                           |           |                                   |
| <b>CN</b> | China                        | <b>KZ</b> | Kasachstan                           | <b>RO</b> | Rumänien                                           |           |                                   |
| <b>CU</b> | Kuba                         | <b>LC</b> | St. Lucia                            | <b>RU</b> | Russische Föderation                               |           |                                   |
| <b>CZ</b> | Tschechische Republik        | <b>LI</b> | Liechtenstein                        | <b>SD</b> | Sudan                                              |           |                                   |
| <b>DE</b> | Deutschland                  | <b>LK</b> | Sri Lanka                            | <b>SE</b> | Schweden                                           |           |                                   |
| <b>DK</b> | Dänemark                     | <b>LR</b> | Liberia                              | <b>SG</b> | Singapur                                           |           |                                   |
| <b>EE</b> | Estland                      |           |                                      |           |                                                    |           |                                   |

# UNGESÄTTIGTE ALIPHATISCHE CARBONSÄUREN (MARACENINE), HERSTELLUNGSVERFAHREN UND MITTEL GEGEN BAKTERIEN

Die Erfindung betrifft ungesättigte aliphatische Carbonsäuren (Maracenine), Verfahren zu ihrer Gewinnung und Mittel mit einem Gehalt an den ungesättigten aliphatischen Carbonsäuren (Maraceninen).

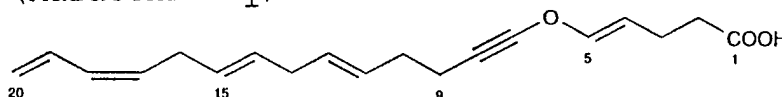
Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ungesättigte aliphatische Carbonsäuren (Maracenine) der allgemeinen Formel:



- wobei, wenn  $x = 2$ ,  $y = 1$  und  $\overset{\cdot\cdot}{=}$  eine Doppelbindung,  $z = 0$ , R fehlt und  $\overset{\cdot\cdot\cdot}{=}$  eine Dreifachbindung oder  $z = 1$ , R ein Cl-Atom und  $\overset{\cdot\cdot}{=}$  eine Doppelbindung ist oder,

- wenn  $x = 3$ ,  $y = 2$  und  $\text{---}$  eine Einfachbindung,  $z = 0$ , R fehlt und  $\text{===}$  eine Dreifachbindung oder  $z = 1$ , R ein Cl-Atom und  $\text{=}$  eine Doppelbindung ist.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin A<sub>1</sub>) der Formel



Maracenin A<sub>1</sub>

$\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -trans,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 300,40,

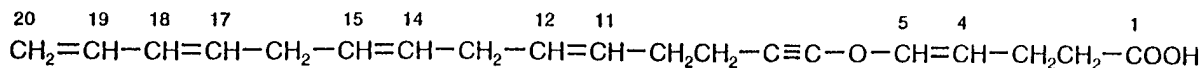
<sup>1</sup>H-NMR gemäß Tabelle 1,

<sup>13</sup>C-NMR gemäß Tabelle 1,

IR (KBr);  $\nu$  = 3014(w), 2925(m), 2855(w), 2280(m), 1712(s), 1673(m), 1662(m), 1554(w), 1434(m), 1412(m), 1351(w), 1222(s), 1175(w), 1059(m), 998(m), 968(m) und 920(m)  $\text{cm}^{-1}$ ; und

UV (Methanol);  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 208 (4,41) und 227 (4,47) nm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin A<sub>2</sub>) der Formel



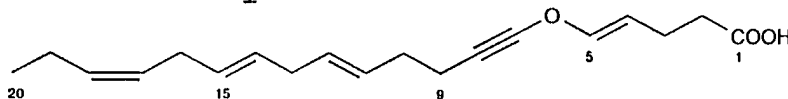
$\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -cis,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 300,40,

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz);  $\delta$  = 2,96 (m, 2H, 15-H) und 2,82 (m, 2H, 12-H) ppm, und

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz);  $\delta$  = 26,1 (C-15) und 25,8 (C-12) ppm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin B<sub>1</sub>) der Formel:



Maracenin B<sub>1</sub>

19,20-dihydro,  $\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -trans,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 302,41,

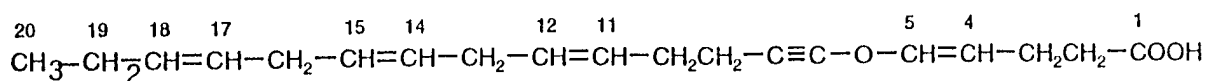
$^1\text{H}$ -NMR gemäß Tabelle 2,

$^{13}\text{C}$ -NMR gemäß Tabelle 2,

IR (KBr);  $\nu$  = 3012(m), 2964(m), 2931(m), 2875(w), 2279(m), 1712(s), 1674(m), 1662(m), 1437(m), 1412(w), 1304(w), 1288(m), 1223(s), 1061(m), 968(m) und 921(m)  $\text{cm}^{-1}$ , und

UV (Methanol);  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 205 (4,37) nm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin B<sub>2</sub>) der Formel:



19,20-dihydro,  $\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -cis,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

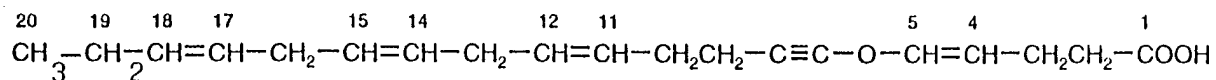
MG 302,41,

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz);  $\delta$  = 2,81 (m, 4H, 12- und 15-H) und

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz);  $\delta$  = 25,8 (C-12) und 25,6 (C-15)

ppm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin B<sub>3</sub>) der Formel:

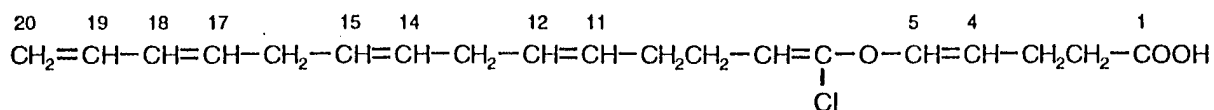


19,20-dihydro, delta<sup>4,5</sup>-cis, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-trans, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 302,41 und

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); delta = 6,21 (d, J = 5,7 Hz, 1H, 5-H) und 4,75 (m, 1H, 4-H) ppm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure der Formel (Maracenin C<sub>1</sub>):



delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-trans, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 336,86,

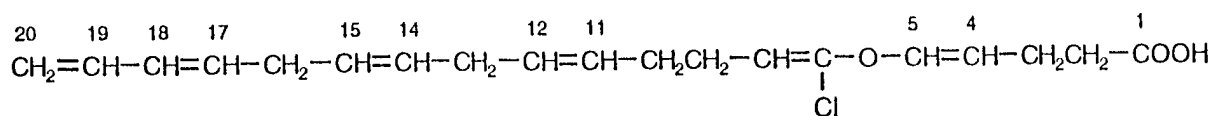
<sup>1</sup>H-NMR gemäß Tabelle 1,

<sup>13</sup>C-NMR gemäß Tabelle 1,

IR (KBr); ν<sub>y</sub> = 3012(w), 2925(m), 2859(w), 1711(s), 1654(n), 1434(m), 1412(w), 1271(m), 1215(m), 1154(s), 1069(w), 997(m), 967(m) und 924(m) cm<sup>-1</sup>, und

UV (Methanol); λ<sub>max</sub> (log epsilon) = 205 (4,25) und 224 (4,22) nm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin C<sub>2</sub>) der Formel:



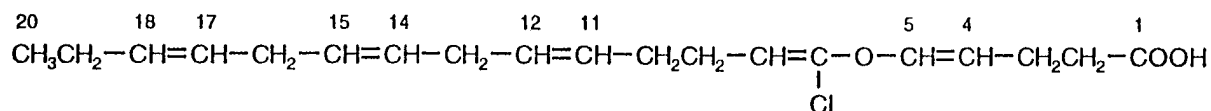
delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-cis, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 336,86 und

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); delta = 2,95 (m, 2H, 15-H) und 2,81 (m, 2H, 12-H) ppm, und

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz); delta = 26,6 (C-15) und 26,1 (C-12) ppm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin D<sub>1</sub>) der Formel:



19,20-dihydro, delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-trans, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 338,88,

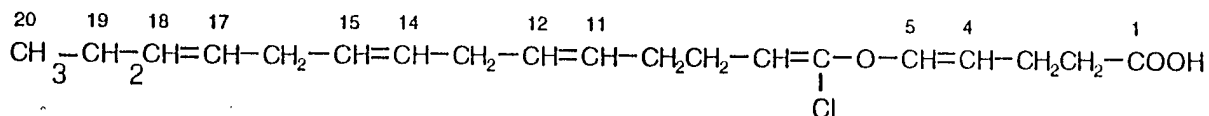
<sup>1</sup>H-NMR gemäß Tabelle 2,

<sup>13</sup>C-NMR gemäß Tabelle 2,

IR (KBr);  $\nu$  = 3011(m), 2963(m), 2929(m), 2873(w), 2856(w), 1713(m), 1654(s), 1446(m), 1409(m), 1270(m), 1155(s), 1069(w), 967(m) und 924(m) cm<sup>-1</sup>, und

UV (Methanol);  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 203 (4,16) nm.

Ferner betrifft die Erfindung eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin D<sub>2</sub>) der Formel:



19,20-dihydro, delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-cis, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 338,88,

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz);  $\delta$  = 2,80 (m, 4H, 12- und 15-H) ppm,  
und

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz);  $\delta$  = 25,7 (C-12) und 25,6 (C-15)  
ppm.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von ungesättigten aliphatischen Carbonsäuren (Maraceninen), dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* So ce 880 = DSM 11252 in einem Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthaltendem wäßrigem Medium aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,
- (b) das Adsorberharz gegebenenfalls mit den Zellen vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol und danach mit Aceton extrahiert,
- (c) die vereinigten Extrakte bis zum Auftreten einer wäßrigen Phase einengt,
- (d) die wäßrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, trocknet und das Lösungsmittel abdampft,
- (e) den angefallenen Rückstand in Methanol löst, die erhaltene Lösung abkühlt und den sich bildenden Niederschlag abtrennt,
- (f) die verbleibende Lösung einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft,
- (g) die Carbonsäuren (Maracene) enthaltenden Fraktionen an HD-SIL-18-20-60 mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer als Laufmittel chromatographiert und eine Fraktion mit w-ungesättigten

und eine Fraktion mit w-gesättigten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält,

- (h) die erhaltenen Fraktionen einer präparativen HPLC-Chromatographie unterwirft und Fraktionen mit separierten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält und die separierten Carbonsäuren isoliert.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von ungesättigten aliphatischen Carbonsäuren (Maraceninen), dadurch gekennzeichnet, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* So ce 1128 = DSM 11253 in einem Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthaltendem wäßrigem Medium aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,
- (b) das Adsorberharz gegebenenfalls mit den Zellen vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol und danach mit Aceton extrahiert,
- (c) die vereinigten Extrakte bis zum Auftreten einer wäßrigen Phase einengt,
- (d) die wäßrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, trocknet und das Lösungsmittel abdampft,
- (e) den angefallenen Rückstand in Methanol löst, die erhaltene Lösung abkühlt und den sich bildenden Niederschlag abtrennt,
- (f) die verbleibende Lösung einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft,
- (g) die Carbonsäuren (Maracene) enthaltenden Fraktionen an HD-SIL-18-20-60 mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer als Laufmit-

tel chromatographiert und eine Fraktion mit w-ungesättigten und eine Fraktion mit w-gesättigten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält,

- (h) die erhaltenen Fraktionen einer präparativen HPLC-Chromatographie unterwirft und Fraktionen mit separierten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält und die separierten Carbonsäuren isoliert.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann man als Adsorberharz Amberlite, insbesondere Amberlite XAD-16 verwenden.

Ferner kann man bei Stufe (d) mit Natriumsulfat trocknen.

Ferner kann man die Gelchromatographie mit Sephadex durchführen, insbesondere mit Sephadex LH-20.

Ferner kann man die präparative HPLC-Chromatographie an einer Umkehrphase durchführen, insbesondere Nucleosil, vorzugsweise Nucleosil 100-C18-7.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Mittel gegen Bakterien, insbesondere Mykobakterien und/oder Nocardien, mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen ungesättigten aliphatischen Carbonsäure (Maracenin) neben üblichen Hilfs-und/oder Trägerstoffen.

Das erfindungsgemäße Mittel kann zur Tuberkulosebehandlung vorgesehen werden.

Nachstehend wird die Erfindung durch Beispiele näher erläutert.

## Beispiel 1: Maracenine A und B

### A. Beschreibung des Produktionsstammes und der biologischen Aktivität.

#### 1. Herkunft, Taxonomie, Morphologie

Der Produktionsorganismus wurde im Juni 1992 an der GBF aus einer Bodenprobe aus der Umgebung von Massai Mara, Kenia, isoliert. Es handelt sich um einen Stamm des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* (Imshenetski und. Solntseva, 1936) (= *Polyangium cellulosum*). Der Stamm wurde mit So ce880 bezeichnet.

Die vegetativen Zellen sind zylindrische Stäbchen mit runden Enden, meist um 1  $\mu\text{m}$  dick und 3 - 6  $\mu\text{m}$  lang. Im Phasenkontrastmikroskop erscheinen sie dunkel. Sie bewegen sich gleitend fort. Auf manchen Nährböden bildet der Organismus massenhaft Fruchtkörper, so z. B. auf Filterpapier über Mineralsalzagar. Die Fruchtkörper sind dunkel rotbraune Polster und bestehen aus einer mehr oder weniger großen Zahl von Sporangiolen, kugeligen oder durch gegenseitige Abplattung polyedrische Gebilde mit einer festen Wand, von 20 bis 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser. In den Sporangiolen befinden sich Myxosporen, stäbchenförmige Dauerzellen von ähnlicher Gestalt und Größe wie die vegetativen Zellen, jedoch im Phasenkontrastmikroskop stark lichtbrechend und trocknungsresistent.

#### 2. Kultur

Der Organismus wächst auf Peptonagar, z. B. CY-Agar (Casitone, Difco, 0,3 %;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 %; Hefeextrakt, Difco, 0,1 %; Agar 1,5%; pH 7,2), dem jedoch ein Kohlenhydrat, z. B. Glucose oder Stärke, zugesetzt werden muß. Das

Kohlenhydrat kann in einer Konzentration von z. B. 0,1 % zugegeben werden.

Gutes Wachstum erfolgt auch auf Hefeagar, z. B. VY/2-Agar (Bäckerhefe 0,5 %, bezogen auf Frischgewicht;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 %; Agar 1,5 %; pH 7,2). Der Stamm baut Chitin und Stärke rasch und kräftig ab. In Flüssigmedien wächst So ce880 teils verklumpt, teils in homogener Zellsuspension, sowohl in Schüttelkolben (bei z. B. 160 Upm), als auch in Bioreaktoren (bis 100 l getestet). Die Kultivierung erfolgt bei 30 °C unter aeroben Bedingungen.

Zur Kultur in Flüssigmedium eignet sich z. B.

Medium Nr. 1: MD1 1.m. (Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, Merck, 0,3 %;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 %; pH 7,2), das durch eine Kohlenhydratquelle ergänzt ist, z. B. Glucose, Stärke, Cellulose, jeweils 0,1 %.

Oder Medium Nr. 2: Glukose .  $\text{H}_2\text{O}$  0,5 %; Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, 0,1 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,15 %;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 %;  $\text{KNO}_3$  0,2 %; Natrium-Eisen III - EDTA 8 mg/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,0125 %; Tris . HCl 0,2 %; pH vor dem Autoklavieren 7,4.

Oder Medium Nr. 3: Stärke, löslich, 0,8 %; Glukose .  $\text{H}_2\text{O}$  0,2 %; Hefeextrakt (Difco) 0,2 %; Sojamehl, entfettet, 0,2 %;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 %; Na-Fe III - EDTA 8 mg/l; HEPES-Puffer 50 mM; pH 7,4 vor dem Autoklavieren.

### 3. Fermentation

Beispiel:

Bioreaktor mit 100 l Inhalt, Fa. Chemap (jetzt Braun Melsungen), Blattrührsystem. Medium Nr. 3 (wie oben), zusätzlich Adsorberharz Amberlite XAD-16, 1 %, v/v (Rohm und Haas, Darmstadt) und Antischaummittel Tegosipon, 10 ml (Goldschmidt AG, Essen), jedoch ohne HEPES.

Der pH vor dem Autoklavieren: 7,8; Temperatur: 30 °C, Rührgeschwindigkeit: 100 U/min, Belüftung: 1800 l Luft pro Stunde. Nach dem Autoklavieren wurde, falls nötig, der pH mit steriler 5 %iger KOH auf 7,9 eingestellt.

Der Fermentor wurde beimpft mit 4,8 l Vorkultur, die in 6 mal 2 l Schüttelkolben mit 800 ml Medium 3 angezogen wurden.

Während der Fermentation wurde ein Absinken des pH-Wertes unter 6,9 durch Zugabe von 5 %iger KOH verhindert.

Tabelle 1: Verlauf der Fermentation

| Zeit<br>(Stunden) | pH  | pO <sub>2</sub><br>(%) | Glukose*<br>(%) | Veränderungen                  |
|-------------------|-----|------------------------|-----------------|--------------------------------|
| 0 (Start)         | 7,9 | 100                    |                 |                                |
| 96                | 7,6 | 75                     | 0,7             |                                |
| 120               | -** | 55                     | -               |                                |
| 145,5             | -   | 48                     | -               |                                |
| 167,5             | 7,3 | 45                     | 0,25            |                                |
| 192,5             | -   | 45                     | -               | Rührgeschwindigkeit: 110 U/min |
| 239,5             | 7,2 | 53                     | 0,25            |                                |
| 263,5             | -   | 65                     | -               | Rührgeschwindigkeit: 100 U/min |
| 287,5             | -   | 44                     | 0,25            |                                |
| 335,5 (Ernte)     | 7,2 | 52                     | 0,05            |                                |

\*) Glukose-Messung mit Diabur-Test 5000 von Boehringer Mannheim

\*\*) - nicht gemessen

#### 4. Leistungen:

Der Stamm bildet während der Fermentation die Maracene A und B. Maracenin A wurde in Methanol gelöst und auf Testblättchen (6 mm Durchmesser) in Mengen von 2 µg aufgetragen. Diese Testblättchen wurden auf Agarplatten gelegt, in denen verschiedene Testorganismen in niedriger Zelldichte eingesäht waren. Diese Testplatten wurden bei 30 °C bebrütet. Nach Wachstum der Testorganismen wurden die Hemmhöfe abgelesen. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle:

Tabelle 2: Wachstum von Testorganismen

| Testorganismus                  | Hemmhof-Durchmesser (mm)<br>Maracenin A |
|---------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 0                                       |
| <i>Bacillus subtilis</i>        | 0                                       |
| <i>Micrococcus luteus</i>       | 0                                       |
| <i>Nocardia corallina</i>       | 29                                      |
| <i>Mycobacterium phlei</i>      | 48                                      |
| <i>Mycobacterium lacticola</i>  | 31                                      |
| <i>Streptococcus faecalis</i>   | 0                                       |
| <i>Escherichia coli</i>         | 0                                       |
| <i>Salmonella typhimurium</i>   | 0                                       |
| <i>Candida albicans</i>         | 0                                       |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>     | 0                                       |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 0                                       |
| <i>Mucor hiemalis</i>           | 0                                       |
| <i>Aspergillus niger</i>        | 0                                       |
| <i>Botrytis cinerea</i>         | 0                                       |

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wurden Maracenin A und B in verschiedenen Konzentrationen in Reagenzgläser gegeben, die eine Suspension der Testorganismen in Nährmedium enthielten. Die Anfangs-Zelldichte war  $10^5$  Zellen/ml. Die Kulturen wurden 18 bis 40 Stunden unter Schütteln bei 30 °C bebrütet.

Als Medien wurden verwendet:

Für Bakterien: Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, Merck, 0,5 %; Proteose Pepton, Difco, 0,5 %; Fleischextrakt, Oxoid, 0,1 %; pH 7,0.

Für Hefen und Pilze "Mycophil"-Medium: Phytone Pepton, BBL, 1 %; Glukose . H<sub>2</sub>O 1 %.

Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle:

Tabelle 3: Minimale Hemmkonzentration

| Testorganismus                    | Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)<br>Maracenin |       |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|-------|
|                                   | A                                               | B     |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 40                                              | 20    |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | 80                                              | 40    |
| <i>Corynebacterium mediolanum</i> | 20                                              | 10    |
| <i>Micrococcus luteus</i>         | 40                                              | 40    |
| <i>Nocardia corallina</i>         | 2,5                                             | 2,5   |
| <i>Mycobacterium phlei</i>        | 0,15                                            | 0,075 |
| <i>Mycobacterium lacticola</i>    | 0,3                                             | 0,15  |

Die minimale Hemmkonzentration für L 929 Maus Fibroblasten in Zellkulturen betrug für Maracenin A und B je 24 µg/ml.

## B. Isolierung

Aus einer 100 l Kultur von *Sorangium cellulosum*, Stamm So ce880, wurden durch Sieben 3,5 kg eines Gemischs aus Amberlite XAD-16 und Zellen abgetrennt. Es wurde nacheinander im Batchverfahren mit insgesamt 12 l Methanol und 11 l Aceton extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum bei 35 °C Badtemperatur bis zum Auftreten der Wasserphase eingeeengt. Diese wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und davon das Lösungsmittel im Vakuum bei 35 °C Badtemperatur abdestilliert. Der Rückstand (53 g) wurde in 150 ml Methanol gelöst und kalt gestellt (4 °C). Der ausgefallene Niederschlag (32 g) wurde durch Zentrifugieren abgetrennt. Das in Lösung verbleibende Rohprodukt (21 g) wurde durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol als Laufmittel fraktioniert. Die Maracenine enthaltenden Fraktionen (1,4 g) wurden an HD-SIL-18-20-60 (Säule: 929 x 90 mm, Laufmittel: Methanol/0,05 mM Ammoniumacetatpuffer 80/20, Fluß: 7 ml/min) chromatographiert. Es wurden 132 mg eines Gemischs aus Maracenin A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> im Verhältnis 8 : 1 sowie 119 mg eines Gemischs bestehend aus Maracenin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> im Verhältnis 25 : 5 : 1 erhalten. Die Trennung der Komponenten erfolgte durch präparative HPLC an Nucleosil 100-C18-7 (Säule: 250 x 16 mm, Fluß: 10 ml/min) mit einem Laufmittelgemisch aus Methanol und 0,05 mM Ammoniumacetatpuffer im Verhältnis 70/30.

Maracenin A<sub>1</sub>       $\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -trans,  $\delta^{17,18}$ -cis

Maracenin A<sub>2</sub>       $\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -cis,  $\delta^{17,18}$ -cis

|                          |                                                                                                                                       |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Maracenin B <sub>1</sub> | 19,20-dihydro, delta <sup>4,5</sup> -trans, delta <sup>11,12</sup> -trans, delta <sup>14,15</sup> -trans, delta <sup>17,18</sup> -cis |
| Maracenin B <sub>2</sub> | 19,20-dihydro, delta <sup>4,5</sup> -trans, delta <sup>11,12</sup> -trans, delta <sup>14,15</sup> -cis, delta <sup>17,18</sup> -cis   |
| Maracenin B <sub>3</sub> | 19,20-dihydro, delta <sup>4,5</sup> -cis, delta <sup>11,12</sup> -trans, delta <sup>14,15</sup> -trans, delta <sup>17,18</sup> -cis   |

### C. Physikalische Eigenschaften

#### Maracenin A<sub>1</sub>:

Summenformel C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>

MG 300.40

DC: Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm, Merck-Art. 5554; Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure-Sprühreagenz und Erhitzen auf 120 °C (->Violettrotfärbung)  
Laufmittel: Dichlormethan/Aceton/Methanol 85/10/5  
R<sub>f</sub>: 0.53

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleoesil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß: 0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumacetatpuffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 7.2 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): s. Tabelle 4

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): s. Tabelle 4

IR (KBr):  $\nu$  = 3014(w), 2925(m), 2855(w), 2280(m), 1712(s), 1673(m), 1662(m), 1554(w), 1434(m), 1412(m), 1351(w), 1222(s), 1175(w), 1059(m), 998(m), 968(m), 920 cm<sup>-1</sup>(m).

UV (Methanol):  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 208 (4.41), 227 nm (4.47).

HPLC-MS (ESI):  $m/z$  = 299 [M-H]

**Maracenin A<sub>2</sub>:**

Charakteristische von Maracenin A<sub>1</sub> abweichende Daten:

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß:  
0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumacetatpuffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 7.0 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  = 2.96 (m, 2H, 15-H), 2.82 ppm (m, 2H, 12-H)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  = 26.1 (C-15), 25.8 ppm (C-12)

**Maracenin B<sub>1</sub>:**

Summenformel C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>

MG 302.41

DC: Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm, Merck-Art. 5554; Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure-Sprühareagenz und Erhitzen auf 120 °C (->Violettrotfärbung)  
Laufmittel: Dichlormethan/Aceton/Methanol 85/10/5  
R<sub>f</sub>: 0.51

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß:  
0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumacetat-  
puffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 9.9 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): s. Tabelle 5

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): s. Tabelle 5

IR (KBr):  $\nu$  = 3012(m), 2964(m), 2931(m), 2875(w), 2279(m),  
1712(s), 1674(m), 1662(m), 1437(m), 1412(w),  
1304(w), 1288(m), 1223(s), 1061(m), 968(m), 921  
cm<sup>-1</sup>(m).

UV (Methanol):  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 205 nm (4.37).

HPLC-MS (ESI):  $m/z$  = 301 [M-H]

Elementaranalyse:

|      |         |        |          |
|------|---------|--------|----------|
| gef. | 74.0 %C | 8.7 %H | 17.2 % O |
| ber. | 75.6 %C | 8.7 %H | 15.9 % O |

**Maracenin B<sub>2</sub>:**

Charakteristische von Maracenin B<sub>1</sub> abweichende Daten:

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß:  
0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumace-  
tatpuffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 8.9 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 2.81 (m, 4H, 12- und 15-H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  = 25.8 (C-12), 25.6 ppm (C-15)

HPLC-MS (ESI):  $m/z$  301 [M-H]

**Maracenin B<sub>3</sub>:**

Charakteristische von Maracenin B<sub>1</sub> abweichende Daten:

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß:  
0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumace-  
tatpuffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm

R<sub>t</sub>: 10.6 min

$^1\text{H}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  = 6.21 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1 H, 5-H),  
4.75 ppm (m, 1H, 4-H)

HPLC-MS (ESI):  $m/z$  301 [M-H]

Tabelle 4: NMR-Daten von Maracenin A<sub>1</sub> in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H: 300 MHz;  
<sup>13</sup>C: 75.5 MHz)

| #  | δ <sub>C</sub> (in ppm) | δ <sub>H</sub> (ppm) | M  | J <sub>H,H</sub> (Hz) |
|----|-------------------------|----------------------|----|-----------------------|
| 1  | 178.0                   | ---                  |    |                       |
| 2  | 34.1                    | 2.43                 | t  | 7.3                   |
| 3  | 21.8                    | 2.31                 | q  | 7.3                   |
| 4  | 108.7                   | 5.57                 | dt | 12.0, 7.3             |
| 5  | 144.6                   | 6.27                 | d  | 12.0                  |
| 7  | 84.1                    | ---                  |    |                       |
| 8  | 44.1                    | ---                  |    |                       |
| 9  | 17.6                    | 2.22                 | m  |                       |
| 10 | 27.2                    | 2.22                 | m  |                       |
| 11 | 128.8                   | 5.43                 | m  |                       |
| 12 | 128.8                   | 5.43                 | m  |                       |
| 13 | 30.5                    | 2.75                 | m  |                       |
| 14 | 129.2                   | 5.43                 | m  |                       |
| 15 | 128.3                   | 5.43                 | m  |                       |
| 16 | 30.8                    | 2.88                 | m  |                       |
| 17 | 130.3                   | 5.43                 | m  |                       |
| 18 | 129.6                   | 6.02                 | t  | 11.0                  |
| 19 | 132.1                   | 6.62                 | dt | 16.8, 11.0            |
| 20 | 117.4                   | 5.19                 | d  | 16.8                  |
|    |                         | 5.10                 | d  | 10.2                  |

Tabelle 5: NMR-Daten von Maracenin B<sub>1</sub> in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H: 300 MHz;  
<sup>13</sup>C: 75.5 MHz)

| #  | δ <sub>C</sub> (in ppm) | δ <sub>H</sub> (ppm) | M    | J <sub>H,H</sub> (Hz) |
|----|-------------------------|----------------------|------|-----------------------|
| 1  | 178.0                   | ---                  |      |                       |
| 2  | 34.1                    | 2.44                 | t    | 7.3                   |
| 3  | 21.9                    | 2.31                 | q    | 7.3                   |
| 4  | 108.7                   | 5.57                 | dt   | 12.0, 7.3             |
| 5  | 144.6                   | 6.27                 | d    | 12.0                  |
| 7  | 84.1                    | ---                  |      |                       |
| 8  | 44.1                    | ---                  |      |                       |
| 9  | 17.6                    | 2.23                 | m    |                       |
| 10 | 27.2                    | 2.23                 | m    |                       |
| 11 | 129.1                   | 5.43                 | m    |                       |
| 12 | 128.5                   | 5.43                 | m    |                       |
| 13 | 30.5                    | 2.72                 | m    |                       |
| 14 | 128.7                   | 5.43                 | m    |                       |
| 15 | 129.0                   | 5.43                 | m    |                       |
| 16 | 30.3                    | 2.72                 | m    |                       |
| 17 | 126.9                   | 5.33                 | m    |                       |
| 18 | 132.3                   | 5.40                 | m    |                       |
| 19 | 20.5                    | 2.03                 | pent | 7.5                   |
| 20 | 14.3                    | 0.95                 | t    | 7.5                   |

## Beispiel 2: Maracenine C und D

### A. Beschreibung des Produktionsstammes und der biologischen Aktivität

#### 1. Herkunft, Taxonomie, Morphologie

Der Produktionsorganismus wurde im Oktober 1994 an der GBF aus einer Bodenprobe von den weißen Bergen auf Kreta isoliert. Es handelt sich um einen Stamm des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* (Imshenetski und. Solntseva, 1936) (= *Polyangium cellulosum*). Der Stamm wurde mit So cell128 bezeichnet.

Die vegetativen Zellen sind zylindrische Stäbchen mit runden Enden, meist um 1 µm dick und 3 - 6 µm lang. Im Phasenkontrastmikroskop erscheinen sie dunkel. Sie bewegen sich gleitend fort. Auf manchen Nährböden bildet der Organismus massenhaft Fruchtkörper, so z. B. auf Filterpapier über Mineralsalzagar. Die Fruchtkörper sind gelbbraune Polster und bestehen aus einer mehr oder weniger großen Zahl von Sporangiolen, kugeligen oder durch gegenseitige Abplattung polyedrische Gebilde mit einer festen Wand, von 20 bis 30 µm Durchmesser. In den Sporangiolen befinden sich Myxosporen, stäbchenförmige Dauerzellen von ähnlicher Gestalt und Größe wie die vegetativen Zellen, jedoch im Phasenkontrastmikroskop stark lichtbrechend und trocknungsresistent.

#### 2. Kultur

Der Organismus wächst auf Peptonagar, z. B. CY-Agar (Casitone, Difco, 0,3 %; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,1 %; Hefeextrakt, Difco, 0,1 %; Agar 1,5%; pH 7,2), dem jedoch ein Kohlenhydrat, z. B. Glucose oder Stärke, zugesetzt werden muß. Das

Kohlenhydrat kann in einer Konzentration von z. B. 0,1 % zugegeben werden.

Gutes Wachstum erfolgt auch auf Hefeagar, z. B. VY/2-Agar (Bäckerhefe 0,5 %, bezogen auf Frischgewicht;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 %; Agar 1,5 %; pH 7,2). Der Stamm baut Chitin rasch und kräftig ab. In Flüssigmedium wächst So cell28 teils verklumpt, teils in homogener Zellsuspension, sowohl in Schüttelkolben (bei z. B. 160 Upm), als auch in Bioreaktoren (bis 100 l getestet). Die Kultivierung erfolgt bei 30 °C unter aeroben Bedingungen.

Zur Kultur in Flüssigmedium eignet sich z. B.

Medium Nr. 1: MD1 1.m (Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, Merck, 0,3 %;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 %; pH 7,2), das durch eine Kohlenhydratquelle ergänzt ist, z. B. Glucose, Stärke, Cellulose, jeweils 0,1 %.

Oder Medium Nr. 2: Glukose  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5 %; Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, 0,1 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,15 %;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 %;  $\text{KNO}_3$  0,2 %; Natrium-Eisen III - EDTA 8 mg/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,0125 %; Tris  $\cdot \text{HCl}$  0,2 %; pH vor dem Autoklavieren 7,4.

Oder Medium Nr. 3: Stärke, löslich, 0,8 %; Glukose  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  0,2 %; Hefeextrakt (Difco) 0,2 %; Sojamehl, entfettet, 0,2 %;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 %; Na-Fe III - EDTA 8 mg/l; HEPES-Puffer 50 mM; pH 7,4 vor dem Autoklavieren.

### 3. Fermentation

Beispiel:

Bioreaktor mit 100 l Inhalt, Fa. Bioengineering, Wald, Schweiz, Blattrührsystem. Medium Nr. 3 (wie oben), zusätzlich Adsorberharz Amberlite XAD-16, 1 %, v/v (Rohm und Haas, Darmstadt) und Antischaummittel Tegospin, 10 ml (Goldschmidt AG, Essen), jedoch ohne HEPES.

Der pH vor dem Autoklavieren: 7,8; Temperatur: 30 °C, Rührgeschwindigkeit: 100 U/min, Belüftung: 1800 l Luft pro Stunde. Falls nötig, wurde der pH nach dem Autoklavieren mit 5 %iger KOH auf 7,9 eingestellt.

Der Fermentor wurde beimpft mit 4,8 l Vorkultur, die in 6 mal 2 l Schüttelkolben mit je 800 ml Medium 3 angezogen wurden. Während der Fermentation wurde ein Absinken des pH-Wertes unter 6,9 durch Zugabe von 5 %iger KOH verhindert.

Tabelle 6: Verlauf der Fermentation

| Zeit<br>(Stunden) | pH  | pO <sub>2</sub><br>(%) | Glukose*<br>(%) |
|-------------------|-----|------------------------|-----------------|
| 0 (Start)         | 7,9 | 100                    | -**             |
| 48                | -   | 88                     | -               |
| 216               | 7,3 | 40                     | 0,5             |
| 264               | 7,2 | 40                     | 0,25            |
| 336               | 7,3 | 58                     | 0               |
| 360 (Ernte)       | 7,3 | 61                     | 0               |

\*) Glukose-Messung mit Diabur-Test 5000 von Boehringer Mannheim

\*\*) - nicht gemessen

#### 4. Leistungen:

Der Stamm bildet während der Fermentation die Maracenine C und D. Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen wurden Maracenin C und D in verschiedenen Konzentrationen in Reagenzgläser gegeben, die eine Suspension der Testorganismen in Nährmedium enthielten. Die Anfangs-Zelldichte war  $10^5$  Zellen/ml. Die Kulturen wurden 18 bis 40 Stunden unter Schütteln bei 30 °C bebrütet.

Als Medien wurden verwendet:

Für Bakterien: Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, Merck, 0,5 %; Proteose Pepton, Difco, 0,5 %; Fleischextrakt, Oxoid, 0,1 %; pH 7,0.

Für Hefen und Pilze "Mycophil"-Medium: Phytone Pepton, BBL, 1 %; Glukose . H<sub>2</sub>O 1 %.

Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle:

Tabelle 7: Minimale Hemmkonzentration

| Testorganismus                    | Minimale Hemmkonzentration (µg/ml)<br>Maracenin |      |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|------|
|                                   | C                                               | D    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 40                                              | 20   |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | 40                                              | 40   |
| <i>Corynebacterium mediolanum</i> | 40                                              | 10   |
| <i>Micrococcus luteus</i>         | 40                                              | 40   |
| <i>Nocardia corallina</i>         | 10                                              | 10   |
| <i>Mycobacterium phlei</i>        | 1,25                                            | 0,63 |
| <i>Mycobacterium lacticola</i>    | 1,25                                            | 5    |

Die minimale Hemmkonzentration für L929 Maus Fibroblasten in Zellkultur lag für Maracenin C und D bei 24 µg/ml.

## B. Isolierung

Aus einer 100 l Kultur von *Sorangium cellulosum*, Stamm So cell128, wurden durch Sieben 3 kg eines Gemischs aus Amberlite XAD-16 und Zellen abgetrennt. Es wurde nacheinander im Batchverfahren mit insgesamt 12 l Methanol und 11 l Aceton extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum bei 35 °C Badtemperatur bis zum Auftreten der Wasserphase eingeengt. Diese wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und davon das Lösungsmittel im Vakuum bei 35 °C Badtemperatur abdestilliert. Der Rückstand (98 g) wurde in 375 ml Methanol gelöst und kalt gestellt (4 °C). Der ausgefallene Niederschlag (77 g) wurde durch Zentrifugieren abgetrennt. Das in Lösung verbleibende Rohprodukt (21 g) wurde durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol als Laufmittel fraktioniert. Die Maracenine enthaltenden Fraktionen (1.7 g) wurden an HD-SIL-18-20-60 (Säule: 929 x 90 mm, Laufmittel: Methanol/0,05 mM Ammoniumacetatpuffer 80/20, Fluß: 7 ml/min) chromatographiert. Es wurden 800 mg eines Gemischs aus Maracenin C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> im Verhältnis 11 : 1 sowie 250 mg eines Gemischs aus Maracenin D<sub>1</sub>, und D<sub>2</sub> im Verhältnis 3 : 1 erhalten. Die Trennung der Komponenten erfolgte durch präparative HPLC an Nucleosil 100-C18-7 (Säule: 250 x 16 mm, Fluß: 10 ml/min) mit einem Laufmittelgemisch aus Methanol und 0.05 mM Ammoniumacetatpuffer im Verhältnis 70/30.

|                          |                                                                                                                                       |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Maracenin C <sub>1</sub> | delta <sup>4,5</sup> -trans, delta <sup>11,12</sup> -trans, delta <sup>14,15</sup> -trans, delta <sup>17,18</sup> -cis                |
| Maracenin C <sub>2</sub> | delta <sup>4,5</sup> -trans, delta <sup>11,12</sup> -trans, delta <sup>14,15</sup> -cis, delta <sup>17,18</sup> -cis                  |
| Maracenin D <sub>1</sub> | 19,20-dihydro, delta <sup>4,5</sup> -trans, delta <sup>11,12</sup> -trans, delta <sup>14,15</sup> -trans, delta <sup>17,18</sup> -cis |
| Maracenin D <sub>2</sub> | 19,20-dihydro, delta <sup>4,5</sup> -trans, delta <sup>11,12</sup> -trans, delta <sup>14,15</sup> -cis, delta <sup>17,18</sup> -cis   |

### C. Physikalische Eigenschaften

#### Maracenin C<sub>1</sub>:

Summenformel C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>Cl                      MG 336.86

DC: Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm, Merck-Art. 5554; Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure-Sprühareagenz und Erhitzen auf 120 °C (->Violettrotfärbung)  
Laufmittel: Dichlormethan/Aceton/Methanol 85/10/5 (v/v/v)  
R<sub>f</sub>: 0.55

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß: 0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumacetatpuffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 8.1 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): s. Tabelle 8

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): s. Tabelle 8

IR (KBr):  $\nu$  = 3012(w), 2925(m), 2859(w), 1711(s), 1654(m),  
1434(m), 1412(w), 1271(m), 1215(m), 1154(s),  
1069(w), 997(m), 967(m), 924  $\text{cm}^{-1}$ (m).

UV (Methanol):  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 205 (4.25), 224 nm  
(4.22).

HPLC-MS (ESI):  $m/z$  = 335  $[\text{M}(^{35}\text{Cl})-\text{H}]$

### Maracenin C<sub>2</sub>:

Charakteristische von Maracenin C<sub>1</sub> abweichende Daten:

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß:  
0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammonium-  
acetatpuffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 7.8 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  = 2.95 (m, 2H, 15-H), 2.81 ppm (m,  
2H, 12-H)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  = 26.6 (C-15), 26.1 ppm (C-12)

### Maracenin D<sub>1</sub>:

Summenformel C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>Cl                      MG 338.88

DC: Aluminiumfolien mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm,  
Merck-Art. 5554; Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure-Sprüh-  
reagenz und Erhitzen auf 120 °C (->Violettrotfärbung)  
Laufmittel: Dichlormethan/Aceton/Methanol 85/10/5 (v/v/v)  
R<sub>f</sub>: 0.62

HPLC: Säule: 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß:  
0.3 ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumacetatpuffer 75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 9.8 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): s. Tabelle 9

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): s. Tabelle 9

IR (KBr):  $\nu$  = 3011(m), 2963(m), 2929(m), 2873(w), 2856(w),  
1713(m), 1654(s), 1446(m), 1409(m), 1270(m),  
1155(s), 1069(w), 967(m), 924(m) cm<sup>-1</sup>.

UV (Methanol):  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 203 nm (4.16).

HPLC-MS (ESI):  $m/z$  = 337 [M(<sup>35</sup>Cl)-H]

Elementaranalyse:

|      |         |        |         |          |
|------|---------|--------|---------|----------|
| gef. | 67.2 %C | 8.0 %H | 14.2 %O | 10.5 %Cl |
| ber. | 67.3 %C | 8.0 %H | 14.2 %O | 10.5 %Cl |

**Maracenin D<sub>2</sub>:**

Charakteristische von Maracenin D<sub>1</sub> abweichende Daten:

HPLC: Säule 2 x 125 mm, Material: Nucleosil<sup>R</sup> 120-5C<sub>18</sub>; Fluß: 0.3  
ml/min; Laufmittel: Methanol/0.01 mM Ammoniumacetatpuffer  
75/25, UV-Detektion: 220 nm  
R<sub>t</sub>: 10.1 min

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  = 2.80 ppm (m, 4H, 12- und 15-H)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  = 25.7 (C-12), 25.6 ppm (C-15)

**Tabelle 8:** NMR-Daten von Maracenin C<sub>1</sub> in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H: 300 MHz;  
<sup>13</sup>C: 75.5 MHz)

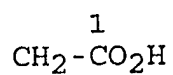
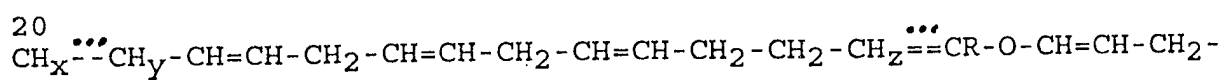
| #  | δ <sub>C</sub> (in ppm) | δ <sub>H</sub> (ppm) | M  | J <sub>H,H</sub> (Hz) |
|----|-------------------------|----------------------|----|-----------------------|
| 1  | 178.5                   | ---                  |    |                       |
| 2  | 34.3                    | 2.43                 | t  | 7.2                   |
| 3  | 22.5                    | 2.30                 | q  | 7.2                   |
| 4  | 110.3                   | 5.22                 | dt | 12.1, 7.2             |
| 5  | 143.2                   | 6.26                 | d  | 12.1                  |
| 7  | 141.5                   | ---                  |    |                       |
| 8  | 109.7                   | 5.14                 | m  |                       |
| 9  | 27.3                    | 2.14                 | m  |                       |
| 10 | 26.4                    | 2.14                 | m  |                       |
| 11 | 129.0                   | 5.42                 | m  |                       |
| 12 | 128.6                   | 5.42                 | m  |                       |
| 13 | 30.4                    | 2.74                 | m  |                       |
| 14 | 129.2                   | 5.42                 | m  |                       |
| 15 | 128.3                   | 5.42                 | m  |                       |
| 16 | 30.8                    | 2.88                 | m  |                       |
| 17 | 130.3                   | 5.42                 | m  |                       |
| 18 | 129.6                   | 6.02                 | t  | 11.0                  |
| 19 | 132.1                   | 6.62                 | dt | 17.0, 11.0            |
| 20 | 117.4                   | 5.19                 | d  | 17.0                  |
|    |                         | 5.10                 | d  | 11.0                  |

Tabelle 9: NMR-Daten von Maracenin D<sub>1</sub> in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H: 300 MHz;  
<sup>13</sup>C: 75.5 MHz)

| #  | δ <sub>C</sub> (in ppm) | δ <sub>H</sub> (ppm) | M    | J <sub>H,H</sub> (Hz) |
|----|-------------------------|----------------------|------|-----------------------|
| 1  | 178.5                   | ---                  |      |                       |
| 2  | 34.3                    | 2.42                 | t    | 7.3                   |
| 3  | 22.5                    | 2.28                 | q    | 7.3                   |
| 4  | 110.2                   | 5.22                 | dt   | 12.3, 7.3             |
| 5  | 143.2                   | 6.26                 | d    | 12.3                  |
| 7  | 141.4                   | ---                  |      |                       |
| 8  | 109.7                   | 5.15                 | m    |                       |
| 9  | 27.3                    | 2.14                 | m    |                       |
| 10 | 26.4                    | 2.14                 | m    |                       |
| 11 | 129.1                   | 5.41                 | m    |                       |
| 12 | 128.5                   | 5.41                 | m    |                       |
| 13 | 30.4                    | 2.73                 | m    |                       |
| 14 | 128.8                   | 5.41                 | m    |                       |
| 15 | 128.9                   | 5.41                 | m    |                       |
| 16 | 30.3                    | 2.73                 | m    |                       |
| 17 | 126.9                   | 5.33                 | m    |                       |
| 18 | 132.3                   | 5.38                 | m    |                       |
| 19 | 20.5                    | 2.03                 | pent | 7.5                   |
| 20 | 14.3                    | 0.95                 | t    | 7.5                   |

### Patentansprüche

1. Ungesättigte aliphatische Carbonsäuren (Maracenine) der allgemeinen Formel:



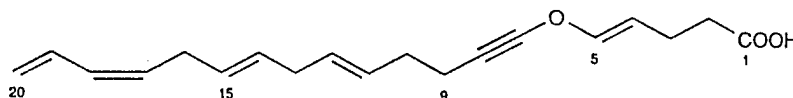
wobei,

- wenn  $x = 2$ ,  $y = 1$  und  $\overset{\cdot\cdot\cdot}{-}$  eine Doppelbindung,  $z = 0$ , R fehlt und  $\overset{\cdot\cdot\cdot}{=}$  eine Dreifachbindung oder  $z = 1$ , R ein Cl-Atom und  $\overset{\cdot\cdot\cdot}{=}$  eine Doppelbindung ist oder,

- 33 -

- wenn  $x = 3$ ,  $y = 2$  und  $\text{---}$  eine Einfachbindung,  $z = 0$ , R fehlt und  $\equiv$  eine Dreifachbindung oder  $z = 1$ , R ein Cl-Atom und  $\equiv$  eine Doppelbindung ist.

2. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin A<sub>1</sub>) der Formel

Maracenin A<sub>1</sub>

delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-trans, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 300,40,

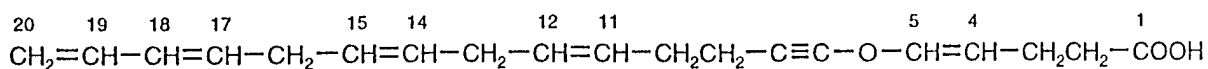
<sup>1</sup>H-NMR gemäß Tabelle 1,

<sup>13</sup>C-NMR gemäß Tabelle 1,

IR (KBr);  $\nu$  = 3014(w), 2925(m), 2855(w), 2280(m), 1712(s), 1673(m), 1662(m), 1554(w), 1434(m), 1412(m), 1351(w), 1222(s), 1175(w), 1059(m), 998(m), 968(m) und 920(m) cm<sup>-1</sup>; und

UV (Methanol);  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 208 (4,41) und 227 (4,47) nm.

3. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin A<sub>2</sub>) der Formel



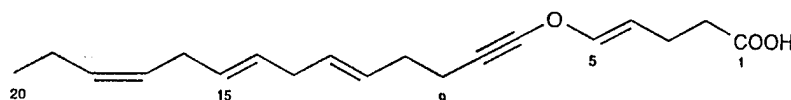
delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-cis, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 300,40,

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz);  $\delta$  = 2,96 (m, 2H, 15-H) und 2,82 (m, 2H, 12-H) ppm, und

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz);  $\delta$  = 26,1 (C-15) und 25,8 (C-12) ppm.

4. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin B<sub>1</sub>) der Formel:



Maracenin B<sub>1</sub>

19,20-dihydro,  $\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -trans,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 302,41,

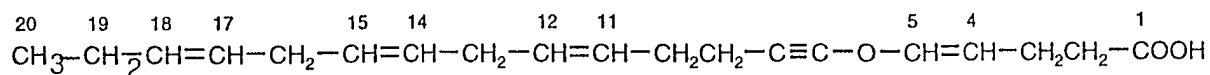
$^1\text{H-NMR}$  gemäß Tabelle 2,

$^{13}\text{C-NMR}$  gemäß Tabelle 2,

IR (KBr);  $\nu$  = 3012(m), 2964(m), 2931(m), 2875(w), 2279(m), 1712(s), 1674(m), 1662(m), 1437(m), 1412(w), 1304(w), 1288(m), 1223(s), 1061(m), 968(m) und 921(m)  $\text{cm}^{-1}$ , und

UV (Methanol);  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 205 (4,37) nm.

5. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin B<sub>2</sub>) der Formel:



19,20-dihydro,  $\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -cis,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

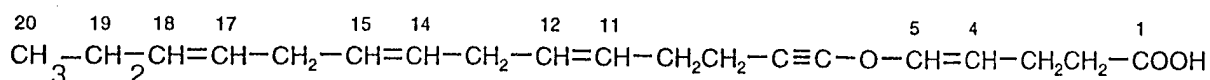
MG 302,41,

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz);  $\delta$  = 2,81 (m, 4H, 12- und 15-H) und

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75,5 MHz);  $\delta$  = 25,8 (C-12) und 25,6 (C-15)

ppm.

6. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin B<sub>3</sub>) der Formel:



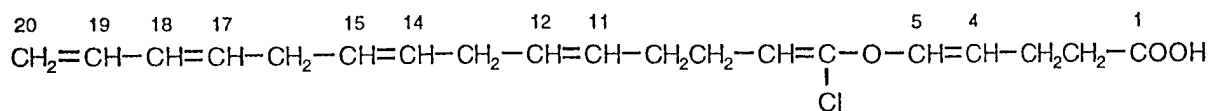
19,20-dihydro,  $\delta^{4,5}$ -cis,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -trans,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 302,41 und

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz);  $\delta$  = 6,21 (d,  $J$  = 5,7 Hz, 1H, 5-H)

und 4,75 (m, 1H, 4-H) ppm.

7. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure der Formel (Maracenin C<sub>1</sub>):



$\delta^{4,5}$ -trans,  $\delta^{11,12}$ -trans,  $\delta^{14,15}$ -trans,  $\delta^{17,18}$ -cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 336,86,

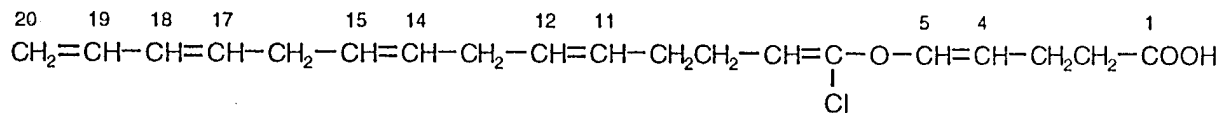
$^1\text{H-NMR}$  gemäß Tabelle 1,

$^{13}\text{C-NMR}$  gemäß Tabelle 1,

IR (KBr);  $\nu$  = 3012(w), 2925(m), 2859(w), 1711(s), 1654(n), 1434(m), 1412(w), 1271(m), 1215(m), 1154(s), 1069(w), 997(m), 967(m) und 924(m)  $\text{cm}^{-1}$ , und

UV (Methanol);  $\lambda_{\text{max}}$  (log epsilon) = 205 (4,25) und 224 (4,22) nm.

8. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin C<sub>2</sub>) der Formel:



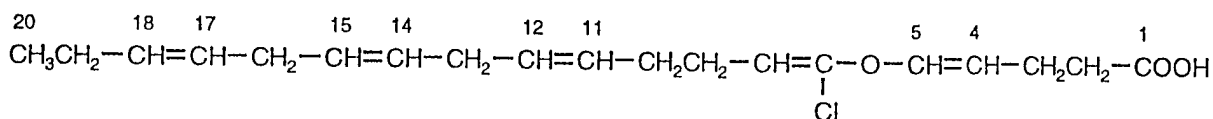
delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-cis, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 336,86 und

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); delta = 2,95 (m, 2H, 15-H) und 2,81 (m, 2H, 12-H) ppm, und

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz); delta = 26,6 (C-15) und 26,1 (C-12) ppm.

9. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin D<sub>1</sub>) der Formel:



19,20-dihydro, delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-trans, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 338,88,

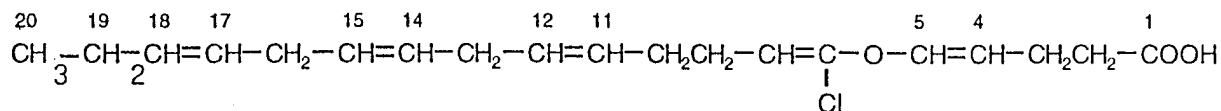
<sup>1</sup>H-NMR gemäß Tabelle 2,

<sup>13</sup>C-NMR gemäß Tabelle 2,

IR (KBr); ν<sub>y</sub> = 3011(m), 2963(m), 2929(m), 2873(w), 2856(w), 1713(m), 1654(s), 1446(m), 1409(m), 1270(m), 1155(s), 1069(w), 967(m) und 924(m) cm<sup>-1</sup>, und

UV (Methanol); λ<sub>max</sub> (log epsilon) = 203 (4,16) nm.

10. Ungesättigte aliphatische Carbonsäure (Maracenin D<sub>2</sub>) der Formel:



19,20-dihydro, delta<sup>4,5</sup>-trans, delta<sup>11,12</sup>-trans, delta<sup>14,15</sup>-cis, delta<sup>17,18</sup>-cis und/oder mit den folgenden Parametern:

MG 338,88,

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz); delta = 2,80 (m, 4H, 12- und 15-H) ppm, und

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz); delta = 25,7 (C-12) und 25,6 (C-15) ppm.

11. Verfahren zur Gewinnung von ungesättigten aliphatischen Carbonsäuren (Maraceninen), dadurch **gekennzeichnet**, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* So ce 880 = DSM 11252 in einem Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthaltendem wäßrigem Medium aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,
- (b) das Adsorberharz gegebenenfalls mit den Zellen vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol und danach mit Aceton extrahiert,
- (c) die vereinigten Extrakte bis zum Auftreten einer wäßrigen Phase einengt,
- (d) die wäßrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, trocknet und das Lösungsmittel abdampft,
- (e) den angefallenen Rückstand in Methanol löst, die erhaltene Lösung abkühlt und den sich bildenden Niederschlag abtrennt,

- (f) die verbleibende Lösung einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft,
- (g) die Carbonsäuren (Maracenine) enthaltenden Fraktionen an HD-SIL-18-20-60 mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer als Laufmittel chromatographiert und eine Fraktion mit w-ungesättigten und eine Fraktion mit w-gesättigten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält,
- (h) die erhaltenen Fraktionen einer präparativen HPLC-Chromatographie unterwirft und Fraktionen mit separierten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält und die separierten Carbonsäuren isoliert.

12. Verfahren zur Gewinnung von ungesättigten aliphatischen Carbonsäuren (Maraceninen), dadurch **gekennzeichnet**, daß man

- (a) *Sorangium cellulosum* So ce 1128 = DSM 11253 in einem Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthaltendem wäßrigem Medium aerob in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,
- (b) das Adsorberharz gegebenenfalls mit den Zellen vom Kulturmedium abtrennt und mit Methanol und danach mit Aceton extrahiert,
- (c) die vereinigten Extrakte bis zum Auftreten einer wäßrigen Phase einengt,
- (d) die wäßrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, trocknet und das Lösungsmittel abdampft,
- (e) den angefallenen Rückstand in Methanol löst, die erhaltene Lösung abkühlt und den sich bildenden Niederschlag abtrennt,

- (f) die verbleibende Lösung einer Gelchromatographie mit Methanol als Laufmittel unterwirft,
  - (g) die Carbonsäuren (Maracenine) enthaltenden Fraktionen an HD-SIL-18-20-60 mit Methanol/Ammoniumacetat-Puffer als Laufmittel chromatographiert und eine Fraktion mit w-ungesättigten und eine Fraktion mit w-gesättigten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält,
  - (h) die erhaltenen Fraktionen einer präparativen HPLC-Chromatographie unterwirft und Fraktionen mit separierten Carbonsäuren (Maraceninen) erhält und die separierten Carbonsäuren isoliert.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch **gekennzeichnet**, daß man als Adsorberharz Amberlite, insbesondere Amberlite XAD-16 verwendet.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch **gekennzeichnet**, daß man bei Stufe (d) mit Natriumsulfat trocknet.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch **gekennzeichnet**, daß man die Gelchromatographie mit Sephadex durchführt, insbesondere mit Sephadex LH-20.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch **gekennzeichnet**, daß man die präparative HPLC-Chromatographie an einer Umkehrphase durchführt, insbesondere Nucleosil, vorzugsweise Nucleosil 100-C18-7.
17. Mittel gegen Bakterien, insbesondere Mykobakterien und/oder Nocardien, mit einem Gehalt an einer ungesättigten aliphatischen Carbonsäure (Maracenin) gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 neben üblichen Hilfs-und/oder Trägerstoffen.

18. Mittel nach Anspruch 17 zur Tuberkulosebehandlung.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/06735

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07C59/60 C12P7/40 A61K31/19

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07C C12P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A        | WO 96 11908 A (PEPTIDE TECHNOLOGY LTD<br>;WOMEN S AND CHILDREN S HOSPITA (AU);<br>FERRA) 25 April 1996<br>see page 1, line 3 - line 11<br>see page 9, line 24 - line 32<br>see figures 1,2<br>----- | 1-10, 17,<br>18       |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 1998

Date of mailing of the international search report

13/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Held, P

### Information on patent family members

PCT/EP 97/06735

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/06735

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07C59/60 C12P7/40 A61K31/19

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07C C12P A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                                  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| A          | WO 96 11908 A (PEPTIDE TECHNOLOGY LTD<br>;WOMEN S AND CHILDREN S HOSPITA (AU);<br>FERRA) 25.April 1996<br>siehe Seite 1, Zeile 3 - Zeile 11<br>siehe Seite 9, Zeile 24 - Zeile 32<br>siehe Abbildungen 1,2<br>----- | 1-10, 17,<br>18    |

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27.April 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/05/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Held, P

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 97/06735

06-05-96