



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **259 207 A1**

4(51) C 12 P 19/56

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 301 083 1	(22)	24.03.87	(44)	17.08.88
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
 (72) Ihn, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Wetzstein, Horst, Dr. rer. nat.; Gräfe, Udo, Prof. Dr. sc. nat.; Eckardt, Klaus, Dr. sc. nat.; Dornberger, Klausjürgen, Dr. rer. nat.; Fleck, Werner, Dr. rer. nat. habil.; Tresselt, Dieter, Dr. rer. nat., DD

(54) **Verfahren zur Herstellung von Aclacinomycin-Y sowie seines Aglykons**

(55) Anthracyclin-Antibiotikum, Aclacinomycin-Y, Krebschemotherapeutikum, mikrobielle Herstellung, Mikroorganismus *Streptomyces spec. AM 33352/S130*, Hinterlegungsnummer ZIMET 43 829

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung des Anthracyclin-Antibiotikums Aclacinomycin-Y sowie seines Aglykons auf mikrobiologischem Wege. Der zur Herstellung benutzte Mikroorganismus *Streptomyces spec. AM 33352/S130* ist in der ZIMET-Hinterlegungsstelle unter der Registriernummer ZIMET 43 829 hinterlegt. Ziel der Erfindung ist die Gewinnung des genannten Anthracyclin-Antibiotikums mit potentiell cancerostatischen Eigenschaften sowie seines Aglykons als Ausgangsprodukt für Mutasynthese und Halbsynthese, um die Palette derartiger Pharmaka zu erweitern. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des Mikroorganismus *Streptomyces spec. AM 33352/S130* in Medien mit geeigneten C-, N-Quellen und Mineralsalzen Aclacinomycin-Y gebildet, mit geeigneten Methoden aus der Kulturlösung isoliert, nachfolgend gereinigt und gegebenenfalls hydrolysiert wird.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Aclacinomycin-Y sowie seines Aglykons, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein neuer Mikroorganismus **Streptomyces spec.** AM 33352/S 130, unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur zwischen 25°C und 37°C während eines Zeitraumes von 44 Stunden bis 96 Stunden kultiviert wird und das gebildete Anthracyclin-Antibiotikum Aclacinomycin-Y aus dem Mycel mittels üblicher Lösungsmittel extrahiert, nachfolgend mit an sich bekannten Methoden konzentriert, chromatographisch gereinigt und gefällt oder mit anorganischen bzw. organischen Säuren in seine Salze überführt oder durch Säurehydrolyse in sein Aglykon umgewandelt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß Wasser-Aceton-Gemische zur selektiven Extraktion des Aclacinomycin-Y aus dem Mycel verwendet werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Fermentationsprozeß bei 28°C über einen Zeitraum von 70 Stunden ausgeführt wird.

Hierzu 1 Seite Formel

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer antibiotisch wirksamen Substanz sowie deren Derivate, die bei der Chemotherapie von Tumor-, Virus- und durch Bakterien hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Nutztier von potentiellem Nutzen sind. Insbesondere betrifft die Erfindung die Gewinnung eines neuen Anthracyclin-Antibiotikums, eines Aklavinonglykosids, das als Aclacinomycin-Y bezeichnet wird, sowie seines Aglykons.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Anthracycline, die ein oder mehrere Zuckerreste enthaltenden Glykoside der Anthracyclinone, stellen antibiotisch wirksame Verbindungen dar. Die biologisch inaktiven Aglykone der Anthracyclin-Antibiotika, die man ihrem Kohlenstoffgerüst nach als Derivate des 7,8,9,10-Tetrahydro-5,12-naphthacenchinons und ihrem chromophoren Molekülteil nach als Hydroxyanthrachinone ansehen kann, werden je nach Zahl und Stellung der α -Hydroxylgruppen am Anthrachinonringsystem in verschiedene Gruppen mit charakteristischen Elektronenabsorptionsspektren unterteilt (Brockmann, 1963. Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe, **21**, 121). Mehr als 100 Anthracycline sind bisher als reine Einzelkomponenten auf mikrobiologischem Wege gewonnen und in ihrer Struktur aufgeklärt worden. Zwei Anthracyclin-Antibiotika der sogenannten ersten Generation (Doxorubicin — US Patent 3590020 und Daunorubicin — GB Patent 1003383) sind seit längerer Zeit auf Grund ihrer chemotherapeutischen Wirksamkeit gegen akute Leukämien und solide Tumoren des Menschen in klinischer Anwendung. Ein wesentliches Problem bei der krebstherapeutischen Anwendung der Anthracycline resultiert aus deren Nebenwirkungen, insbesondere der Herztoxizität. Anthracycline der zweiten Generation wie z.B. Aclacinomycin-A, ein Aklavinonglykosid, weisen gegenüber solchen der sogenannten ersten Generation erhebliche Vorteile in ihrer therapeutischen Effektivität auf. Dennoch hält die Suche nach neuen Vertretern und Derivaten bekannter Kanzerostatika mit verbesserter Wirkung weiter an, da auch Anthracycline der zweiten Generation nicht alle Anforderungen erfüllen.

Es ist bekannt, daß Glykoside des Aklavinons auf mikrobiologischem Wege hergestellt werden können. Aklavinon und Glykoside davon wurden bisher in Fermentationslösungen folgender Mikroorganismen-Arten identifiziert: **Streptomyces spec.** Stamm A1165 (Strehlitz und Mitarb., 1956. J. Bacteriol., **72**, 90); **Streptomyces galilaeus** Stamm JA 3043 (Eckhardt, 1967. Chem. Ber., **100**, 2561); Stamm MA 144-M1, ATCC 31133 (Oki und Mitarb., 1975. J. Antib. **28**, 830; 1977. J. Antib., **30**, 683; 1979. J. Antib., **32**, 791) Stamm OBB-731, ATCC 31615 (1981. EP-O 050725); **Streptomyces lavendofoliae** Stamm 12/3-A/CBS Nr. 26183 (1982. AT-PS Nr. 379828). Von den bekannten Bildnern wird das hier beschriebene Aclacinomycin nicht oder nur in Spuren als Nebenkomponente synthetisiert.

Weiterhin ist bekannt, daß der endständige Zucker (L-Cinerulose A) des Anthracyclin-Antibiotikums Aclacinomycin-A enzymatisch zur L-Aculose oxydiert werden kann und zu dem hier beschriebenen Aclacinomycin-Y führt. (Yoshimoto und Mitarb., 1979. J. Antib., **32**, 472).

Die Nachteile dieses enzymatischen Verfahrens bestehen in der Verwendung teurer Einsatzstoffe bzw. in der aufwendigen Präparation des benötigten Enzyms.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat die ökonomisch günstige Herstellung von Aclacinomycin-Y sowie vom Aglykon und der Salze des Anthracyclin-Antibiotikums zum Ziel.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Aclacinomycin-Y nach einem mikrobiologischen Verfahren herzustellen, das die Nachteile der bekannten technischen Lösungen vermeidet.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß in dem neuen Verfahren der Mikroorganismus Stamm AM 33352/S130

Verwendung findet, der in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, 6900 Jena, Beutenbergstr. 11, unter der Nummer ZIMET 43829 hinterlegt wurde. Dieser Mikroorganismus, der es gestattet, Aclacinomycin-Y aus leicht zugänglichen Rohstoffen mit guter Ausbeute herzustellen, konnte überraschenderweise aus der Population eines Streptomyces-Stammes isoliert werden, der als Bildner der Aklanonsäure (DD 225714, 7.8.1985) bekannt war. Durch Vergleich seiner Eigenschaften mit den in der Literatur angegebenen Eigenschaften von Aclacinomycin-Bildnern (Intern. Streptomyces Project, Shirling und Gottlieb 1972: Intern. J. Syst. Bact., 22, 265–394) konnte der Mikroorganismus AM 33352/S130 keiner der bekannten Arten von Aclacinomycin-Bildnern zugeordnet werden.

Die Kultivierung des Stammes AM 33352/S130 sowie seiner Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. An Erde lyophil getrocknetes Sporenmateriel bzw. Mycelfragmente werden in Agarnährböden und nachfolgend in flüssige vorher sterilisierte Nährmedien geimpft und das entstehende Mycel wird in an sich bekannter Weise bei einer Temperatur zwischen 25°C und 37°C, vorzugsweise 28°C, über einen Zeitraum von 44 Stunden bis 96 Stunden, vorzugsweise 70 Stunden, bei einer Acidität kultiviert, die zu Beginn des Fermentationsprozesses zwischen pH 6,2 und pH 7,0 und am Ende des Prozesses zwischen pH 7,5 und pH 8,3 liegt. Das Nährmedium besteht aus Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie aus anorganischen Salzen. Als Kohlenstoffquellen können Stärke, Glukose, Glycerol, Mannit, Dextrin, Saccharose, Sojaöl und Sojamehl verwendet werden. Als Stickstoffquellen kommen außer den oben erwähnten stickstoffhaltigen Substraten auch Trockenhefe, Fleischpepton und Casein in Frage. Gute Ergebnisse können bei Zusatz von Mineralsalzen erzielt werden. Letztere begünstigen den Verlauf der Fermentation in Abhängigkeit vom eingesetzten Nährmedium. In komplexen Medien, die verschiedene Mehle enthalten, haben sich Zusätze von Kaliumkarbonat, Natrium- bzw. Kaliumphosphat als vorteilhaft erwiesen. Die Fermentation des Bildners AM 33352/S130 kann in Steilbrustflaschen und Rundkolben verschiedenen Inhalts, im Glasfermenter sowie in V2A-Stahl tanks durchgeführt werden. Die Isolierung des Aclacinomycin-Y wird in der Weise durchgeführt, daß das Antibiotikum aus dem Mycel mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln extrahiert, nach Konzentrieren der Extrakte mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel reextrahiert, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, vom Lösungsmittel durch Destillieren im Vakuum befreit und auf üblichem Wege säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt wird. Die Aclacinomycin-Y haltigen Fraktionen werden vereinigt und zur Trockene gebracht. Durch Umfällen des Rückstandes aus Chloroform/Hexan erhält man das reine Antibiotikum in Form eines gelben Pulvers, das sich gut in Chloroform, Toluol, mäßig in niederen Alkoholen und fast nicht in Wasser und Petroläther löst. Das basische Anthracyclin bildet bei der Umsetzung mit der äquivalenten Menge methanolischer Salzsäure in Äther ein rotes Hydrochlorid, das gut löslich ist in Wasser und niederen Alkoholen, dagegen nahezu unlöslich in Chloroform und Ether. Bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren in der Wärme liefert das Anthracyclin ein in saurer wäßriger Lösung unlösliches Aglykon, das durch vergleichende dünnschichtchromatographische und verschiedene spektroskopische (MS, UV/VIS, IR) Untersuchungen als Aklavinon (Gordon und Mitarb., 1960. Teträh. Letters 28–34) identifiziert wurde.

Daß es sich bei dem hier beschriebenen Anthracyclin um eine reine Einzelkomponente handelt, wurde neben dünnschichtchromatographischen Untersuchungen auch durch die HPLC-Analyse bewiesen. Bei den von uns angewendeten Bedingungen zur Trennung von Aklavinonglykosiden (CGC-Säule, Separon SIX, 5 µm, 150 × 3,3 mm, Laborät. Pflstr., Prag, ČSSR; Eluent: Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser/Triethylamin = 700/90–200/90/10–20/0,1) beträgt die relative Retention von Aclacinomycin-Y bezogen auf die von Aclacinomycin-A:

$$\alpha = \frac{t_A - t_0}{t_Y - t_0} = 1,12$$

Die in Abb. 1 dargestellte Struktur des Antibiotikums wurde durch chemische Abbau- und Derivatisierungsreaktionen sowie durch verschiedene spektroskopische Untersuchungen im intakten Antibiotikum-Molekül bewiesen.

Spektroskopische Daten von Aclacinomycin-Y:

UV/VIS max (Chloroform) nm: 259, 290, 432

IR_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3475, 2970, 2930, 2820, 2770, 1735, 1695, 1670, 1620, 1600, 1005

¹H-NMR-Spektrum: Die Daten der ¹H-NMR-Analyse, die in Tab. 1 zusammengefaßt sind, befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Daten für Aclacinomycin-Y (Yoshimoto u. Mitarb., 1979. J. Antib., 32, 472).

Aclacinomycin-Y besitzt eine starke antibiotische Aktivität, wobei bevorzugt das Wachstum von grampositiven Bakterien und Mycobakterien gehemmt wird. Im Vergleich zur entsprechenden Wirksamkeit des klinisch als Krebschemotherapeutikum eingesetzten Anthracyclin-Antibiotikums Aclacinomycin-A zeigt Aclacinomycin-Y gegen verschiedene grampositive Bakterien eine vier- bis zehnfach größere Aktivität (Yoshimoto und Mitarb., 1979. J. Antib., 32, 472). Aclacinomycin-Y kann daher als ein Anthracyclin-Antibiotikum angesehen werden, dessen biologische Wirkung eine potentielle Anwendung als Chemotherapeutikum gegen Tumor-, Virus- und durch Bakterien hervorgerufene Erkrankungen bei Mensch und Nutztier ermöglicht.

Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispielen dienen dazu, die Erfindung zu erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

1. Zwei 500 ml Steilbrustflaschen enthalten je 80 ml des folgenden Vorzuchtmediums:

Glukose	1,5 %
Sojamehl	1,5 %
Na-chlorid	0,5 %
Ca-Karbonat	0,1 %
primäres K-Phosphat in Leitungswasser	0,1 %

Sterilisation: 35 Minuten bei 110°C.

Acidität nach Sterilisation liegt bei pH 6,3. Jede Steilbrustflasche wird mit einer Sporensuspension oder Mycelsuspension des Aclacinomycin-Bildners AM 33352/S130 beimpft, welche mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung von einer im Reagenzglas auf folgenden Anzucht-Nährböden gezüchteten, 10 bis 14 Tage alten Kultur des Aclacinomycin-Bildners hergestellt wird.

Hafermehl	1,0%
Haferflocken, gemahlen	1,0%
Agar-Agar	2,0%
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 Minuten bei 120°C, natursauer. Die beimpften Vorzuchtulturen werden 48 Std. bei 28°C auf einem Schüttelgerät mit einer Frequenz von 180 U/min bebrütet. 8 ml einer so bebrüteten Vorzuchtkultur dienen zur Beimpfung von 500-ml-Steilbrustflaschen, die je 80 ml des folgenden Produktionsmediums enthalten:

Glukose	3,0%
Sojamehl	1,0%
Na-Chlorid	0,5%
Ca-Karbonat	0,3%
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 Minuten bei 115°C. Die Acidität beträgt nach Sterilisation pH 6,3. Die Temperatur während der Fermentation liegt bei 28°C und die Schüttelfrequenz bei 180 U/min.

- Mit einer Kultur des Aclacinomycin-Y-Bildners von einem festen Nährboden, wie oben beschrieben, beimpft man 80 ml des oben angeführten flüssigen Vorzucht-Mediums, welches in einer 500-ml-Steilbrustflasche enthalten ist. Man bebrütet 48 Std. bei 28°C auf einem Schüttelgerät mit einer Schüttelfrequenz von 180 U/min. 12 ml der so erhaltenen Kulturbrühe dienen zur Beimpfung von 400 ml des gleichen Vorzucht-Mediums, welches in einem 2-l-Glaskolben enthalten ist. Man bebrütet weitere 24 Std. bei 28°C bei einer Schüttelfrequenz von 180 U/min, ehe die so erhaltenen 400 ml Kulturbrühe zur Beimpfung von 20 l des oben beschriebenen Produktionsmediums dienen. Letzteres ist in einem 32-l-Glasfermenter enthalten. Während der 72stündigen Fermentation, die mit einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/min und mit einer Luftzufuhr von 15 l/min ausgeführt wird, kann die Schaumbildung durch Zusatz kleiner Mengen von Sonnenblumenöl oder anderer Schaumschutzmittel kontrolliert werden. 20 l auf diese Weise gewonnene Kulturlösung werden mit Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt und separiert. Man erhält 1,5 kg Mycel, die zunächst mit 7,5 l Aceton und anschließend mit 4 l Chloroform kurzzeitig (30 Minuten) ausgerührt werden. Das von den Lösungsmitteln abfiltrierte Mycel wird dann mit 2 l Wasser und 4 l Aceton 24 Stunden gerührt, das Lösungsmittel abfiltriert, im Vakuum bis zur wäßrigen Phase konzentriert und mit Chloroform erschöpfend reextrahiert. Die vereinigten Chloroformreextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der ölige Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und an Kieselgel (0,063–0,2 mm, 0,5 m KH₂PO₄-gepuffert) mit Chloroform/Methanol = 99/1 bis 95/5 chromatographiert. Fraktionen, die dünn-schichtchromatographisch einheitliches Aclacinomycin-Y enthalten, werden vereinigt, im Vakuum das Lösungsmittel abdestilliert, der ölige Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und das Antibiotikum mit Hexan gefällt. Man erhält 250 mg Aclacinomycin-Y rein, das zur Feinstreinigung nochmals chromatographiert, mit Wasser gewaschen und aus Chloroform/Hexan umgefällt werden kann.
2. Man verfährt wie im Beispiel 1, mit dem Unterschied, daß das Produktions-Medium folgende Zusammensetzung hat:

Sojamehl	2,0%
Glukose	2,0%
Kartoffelstärke	2,0%
primäres K-Phosphat	0,025%
Na-Chlorid	0,25%
Ca-Karbonat	0,5%
Mg-Sulfat	0,05%
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 Minuten bei 115°C. Die Acidität liegt nach der Sterilisation bei pH 6,2.

Tabelle 1

Charakteristische ¹H-NMR-Daten von Aclacinomycin-Y in CDCl₃ (200 MHz-Gerät).

Die chemischen Verschiebungen (Angaben in ppm) beziehen sich auf Tetramethylsilan als inneren Standard.

1-H	7,83 D, D	¹ H-1, H-2 = 7 Hz
2-H	7,69 T	¹ H-2, H-3 = 8,5 Hz
3-H	7,31 D, D	¹ H-1, H-3 ca. 1,5 Hz (nicht aufgelöst)
4-OH	12,04 S, b	
6-OH	12,69 S, b	
9-OH	4,57 S, b	
7-H	5,27 M	
10-H	4,11 S	
11-H	7,69 S	
14-Me	1,08 T	J = 7 Hz
16-OMe	3,69 S	
1'-H	5,52 M	W _{1/2} = 6 Hz
N(Me) ₂	2,16 S	
4'-H	ca. 3,75 S, b	W _{1/2} ca. 1 Hz
5'-H	ca. 4,50 Q	J = 6,5 Hz

6'-Me	1,18 D	J = 6,5 Hz
1"-H	5,04 M	$W_{1/2}$ ca. 6 Hz
5"-H	4,00 Q	J = 6 Hz
6"-Me	1,28 D	J = 6 Hz
1'''-H	5,27 D	$^J\text{H-1}''', \text{H-2}''' = 3,2 \text{ Hz}$
2'''-H	6,87 D, D	$^J\text{H-2}''', \text{H-3}''' = 10,4 \text{ Hz}$
3'''-H	6,11	
5'''-H	4,76 Q	J = 7 Hz
6'''-Me	1,41 D	J = 7 Hz

Abkürzungen: S = Singulett; D = Dublett; D,D = doppeltes Dublett; T = Triplett; Q = Quartett; b = Signal verbreitert;
 $W_{1/2}$ = Signalbreite in halber Höhe; M = Multipllett.

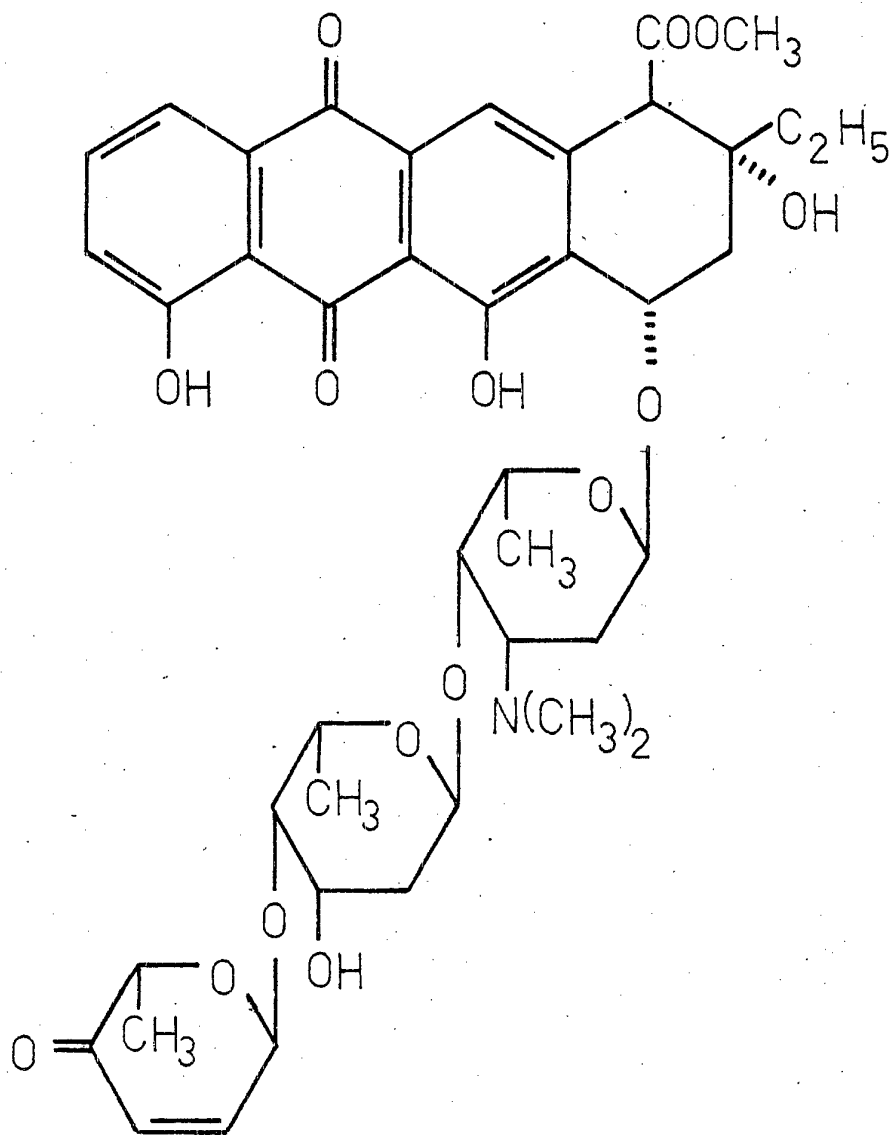


Abb.1