PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/11084**
C07D 309/32, A61K 31/35	**A1**	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. März 1998 (19.03.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04954

(22) Internationales Anmeldedatum: 10. September 1997 (10.09.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 36 721.2 10. September 1996 (10.09.96) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: REICHENBACH, Hans [DE/DE]; (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; (DE). GERTH, Klaus [DE/DE]; (DE). WASHAUSEN, Peter [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

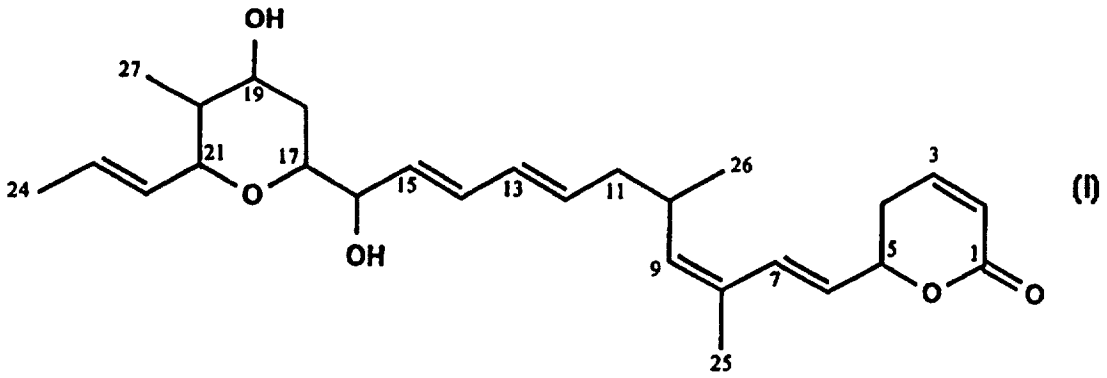
(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: ANTIBIOTIC AND ANTITUMORAL COMPOUND, PROCESS FOR THE MANUFACTURE THEREOF, AGENT CONTAINING THIS COMPOUND AND DSM 11 071

(54) Bezeichnung: ANTIBIOTISCHE UND ANTITUMORALE VERBINDUNG, HERSTELLUNGSVERFAHREN, MITTEL UND DSM 11 071



(I)

(57) Abstract

The invention relates to a compound with antibiotic and antitumoral activity, having formula (I). Also disclosed is a process to produce an antibiotic and an antitumoral agent containing the compound. Finally, the invention concerns the *Sorangium cellulosum* strain DSM 11 071.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Verbindung mit antibiotischer und antitumoraler Aktivität der Formel (I). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung sowie ein antibiotisches und ein antitumorales Mittel mit einem Gehalt an der Verbindung. Schließlich betrifft die Erfindung den *Sorangium cellulosum* Stamm DSM 11 071.

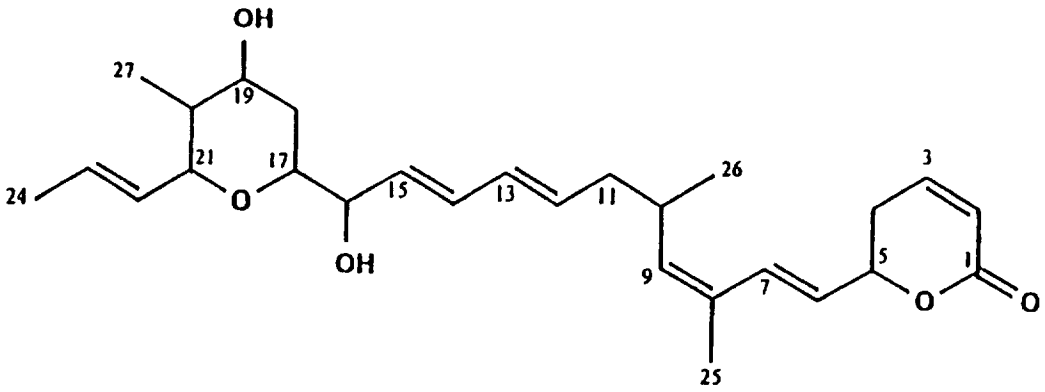
LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

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

Antibiotische und antitumorale Verbindung, Herstellungsverfahren, Mittel und DSM 11 071

Gemäß einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Verbindung mit antibiotischer und antitumoraler Aktivität der Formel:



Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Verbindung (Ratjadon B) der Summenformel $C_{27}H_{38}O_5$ und mit den folgenden Parametern:

^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1,

UV-Spektrum (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 229 (4,57) und 241 (sh; 4,52) nm,

IR-Spektrum (KBr): ny = 2964 (s), 2919 (s), 2880 (s), 1720 (vs), 1382 (s), 1249 (s), 1078 (s), 1058 (s), 1036 (s), 1013 (s), 991 (s) und 968 (s) cm^{-1}.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Verbindung mit anitbiotischer und antitumoraler Aktivität, dadurch gewinnbar, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* Stamm So ce477 = DSM 11 071 in einem C- und N-Quellen sowie Mineralsalze enthaltenden wäßrigen Medium gegebenenfalls in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,

(b) Ratjadon B,

(b1) sofern ohne Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus den *Sorangium cellulosum*-Zellen und/oder dem Kulturmedium oder mit Essigsäureethylester extrahiert oder

(b2) sofern in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus dem Adsorberharz mit Methanol eluiert, das Eluat einengt und mit Essigsäureethylester extrahiert,

(c) den Essigester abzieht und den öligen Rückstand in Methanol löst,

(d) die methanolische Lösung über Kieselgel filtriert und mit Methanol eluiert,

(e) das methanolische Eluat einengt und an einer C_{18}-Umkehrphase einer HPLC-Chromatographie mit einem Methanol/Wasser-Gemisch als Laufmittel unterwirft,

(f) Fraktionen mit einem Gehalt an Ratjadon B (Detektion: 230 nm) sammelt und Ratjadon B isoliert.

Die zu isolierende Verbindung kann dadurch gewinnbar sein, daß man in Stufe (a) mit Amberlite^R XAD-16 als Adsorberharz arbeitet. Bei Stufe (e) kann man mit Nucleosil^R-100 RP 18 chromatographieren.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform gemäß der Erfindung wird ein Verfahren zur Gewinnung einer erfindungsgemäßen Verbindung vorgesehen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* Stamm So ce477 = DSM 11 071 in einem C- und N-Quellen sowie Mineralsalze enthaltenden wäßrigen Medium gegebenenfalls in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,

(b) Ratjadon B,

(b1) sofern ohne Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus den *Sorangium cellulosum*-Zellen und/oder dem Kulturmedium mit Essigsäureethylester extrahiert oder

(b2) sofern in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus dem Adsorberharz mit Methanol eluiert, das Eluat einengt und mit Essigsäureethylester extrahiert,

(c) den Essigester abzieht und den öligen Rückstand in Methanol löst,

(d) die methanolische Lösung über Kieselgel filtriert und mit Methanol eluiert,

(e) das methanolische Eluat einengt und an einer C_{18}-Umkehrphase einer HPLC-Chromatographie mit einem Methanol/Wasser-Gemisch als Laufmittel unterwirft,

(f) Fraktionen mit einem Gehalt an Ratjadon B (Detektion: 230 nm) sammelt und Ratjadon B isoliert.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft *Sorangium cellulosum* So ce477 = DSM 11 071.

Schließlich betreffen weitere Ausführungsformen der Erfindung eine antibiotisches Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung sowie ein antitumorales Mittel mit einem Gehalt an einer erfindungsgemäßen Verbindung.

Nachstehend wird die Erfindung durch experimentelle Daten näher erläutert.

Ratjadon B aus *Sorangium cellulosum* So ce477

Produktionsstamm: *Sorangium cellulosum* gehört zur Ordnung der Myxococcales, Unterordnung Sorangineae, Familie Polyangiaceae. Der Produktionsstamm *Sorangium cellulosum* So ce477 wurde 1989 aus einer Bodenprobe von den Victoria Falls, Zimbabwe, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter DSM 11 071 hinterlegt.

Stammkultur und morphologische Beschreibung: Stammkulturen werden gehalten auf VY/2-Agar (0,5 % Bäckerhefe nach Frischgewicht; 0,1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$; 1,5 % Agar; pH 7,2) oder auf Filterpapier über ST21-Agar (0,1 % KNO_3; 0,1 % $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$; 0,1 % K_2HPO_4; 0,01 % $MnSO_4 \times 7H_2O$; 0,02 % $FeCl_3$; 0,002 %

Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung, z. B. nach G. Drews, Mikrobiologisches Praktikum, 2. Auflage, S. 6., Berlin, Springer Verlag (1974); 1 % Agar. Die Platten werden bei 30 °C bebrütet.

Auf Filterpapier über Mineralsalzagar oder auf Hefeagar (VY/2-Agar) bildet der Stamm große hell orange Schwarmkolonien mit vielen gelborange bis schwarzbraunen Fruchtkörpern. Letztere bestehen aus kleinen Sporangiolen von 15 bis 20 µm Durchmesser, die in mehr oder weniger großen Haufen dicht gepackt liegen; die Haufen messen meist zwischen 50 und 150 µm Durchmesser. Die vegetativen Stäbchen haben die für *Sorangium* typische Form: relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3 bis 5 µm lang und um 1 µm dick.

Leistungen: Der Stamm So ce477 produziert Ratjadon B als Hauptkomponente. Diese Substanz hemmt das Wachstum zahlreicher Pilze und Hefen, gegen alle getesteten Bakterien war der Wirkstoff unwirksam. Bemerkenswert ist die sehr starke Wirkung gegenüber tierischen Zellkulturen. Eine IC-50 gegen die Hela Zelllinie KB3.1 von nur 40 pg/ml weist auf eine antitumorale Wirkung von Ratjadon B hin.

Produktion der Aktivitäten: Das Produktionsmedium kann folgende Zusammensetzung haben (in g/l destilliertes Wasser): Soyabohnenmehl 2; Glukose (Maizena) 2; Stärke (Maizena) 8; Hefeextrakt (Marcor) 2; $CaCl_2$ x $2H_2O$ 1; $MgSO_4$ x $7H_2O$ 1; Ethylendiamin-tetraessigsäure Eisen (III)-Natriumsalz 0,008; HEPES 11,9. Der pH-Wert des Mediums wird vor dem Autoklavieren auf 7,2 eingestellt. Kultiviert wird in 1 l Erlenmeyerkolben mit 250 ml des obigen Mediums und 2 % XAD-16 Adsorberharz (Rohm und Haas, Frankfurt). Die Kolben werden bei 30 °C auf einem Rundschüttler bei 180 U/m für 7 Tage inkubiert. Ratjadon B wird während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert und bindet quantitativ an das Adsorberharz. In Abwesenheit

von XAD kann es sowohl aus den Zellen als auch aus dem Kulturüberstand isoliert werden.

Hemmspektrum von Ratjadon B im Plattendiffusionstest.

Testorganismus	Durchmesser des Hemmhofes[a] (mm)	MHK (µg/ml)
Phytophthora drechsleri DSM[b] 62679	30	0,04
Mucor hiemalis DSM 2655	40	0,09
Schizosaccharomyces pombe Tü[c] 501	36	0,09
Alternaria solani DSM 2954	10	0,6
Taphrina deformans DSM 4398	22	

[a] Testblättchen (6 mm Durchmesser) mit 10 µg Ratjadon B
[b] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig
[c] Stammsammlung, Universität Tübingen

Isolierung von Ratjadon B

4,2 Liter Kulturmedium werden dreimal mit je 500 ml Essigester extrahiert. Die Essigesterphasen werden vereinigt und das Lösungsmittel wird abgezogen. Der braunrote ölige Rückstand wird in 10 ml Methanol gelöst und über 200 ml Kieselgel 60 (0,063 bis 0,2 mm Korngröße; 4 cm Säulenduchmesser) filtriert. Die ersten 100 ml Methanol-Eluat enthalten Ratjadon B.

Trennung der Komponenten

Präparative HPLC:

Das Eluat wird auf ein Volumen von ca. 5 ml eingeengt und in mehreren Läufen durch präparative RP-HPLC getrennt (Säulenabmessungen: 250 x 20 mm; Säulenmaterial: RP 18, 100 Å, 7 µ; Laufmittel: MeOH/H_2O 70/30, Flußrate: 28 ml/min; Detektion: 230 nm).
Retentionszeit: Ratjadon B = 27 min.

Analytische HPLC:
(Säule: 125 x 2 mm, Nucleosil 120-5 C18, 5 µ; Laufmittel: linearer Gradient MeOH/H_2O 60/40 in 20 min auf MeOH/H_2O 80/20; Flußrate 0,3 ml/min; Detektion 230 nm)
Retentionszeit: Ratjadon B = 10,8 min.
Ausbeute an Ratjadon B: 17,3 mg

Charakterisierung:
Ratjadon B: $C_{27}H_{38}O_5$ (442)
Struktur: **Abb. 1.**
UV (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 229 nm (4,57), 241 nm (sh; 4,52).
IR (KBr): ny = 2964 (s), 2919 (s), 2880 (s), 1720 (vs), 1382 (s), 1249 (s), 1078 (s), 1058 (s), 1036 (s), 1013 (s), 991 (s), 968 (s).
^1H und ^{13}C-NMR: s. Tabelle 1.
Molmasse: (-)-FAB-MS (TEG) (negativ-Ion) [M-H] = 441,2675.

Literatur zu Ratjadon A:

1) D. Schummer, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, Liebigs Ann. Chem., (**1995**) 685-688.

2) K. Gerth, D. Schummer, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, J. Antibiot., **48** (1995) 973-976.

Tabelle 1. NMR-Daten von Ratjadon B in $CDCl_3$
^1H: 300 MHz; ^{13}C: 150 MHz.

H	δ_H [ppm]	m_H	i, j	J [Hz]	C	δ_C [ppm]	m_C
-					1	164.16	s
2-H	6.04	ddd	3, 4a, 4b	9.9; 1.8; 1.8	2	121.66	d
3-H	6.89	ddd	2, 4a, 4b	9.8; 4.1; 4.3	3	144.76	d
4-H_2	2.47	m			4	30.05	t
5-H	4.99	dddd	4a, 4b, 6, 7	6.6; 7.2; 6.7; 1.1	5	78.58	d
6-H	5.70	dd	5, 7	6.7; 15.6	6	125.41	d
7-H	6.70	bd	6	15.6	7	130.77	d
-					8	129.57	s
9-H	5.24	dq	10, 25	9.8; 1.2	9	138.94	d
10-H	2.66	ddq	9, 11, 26	9.7; 7.0; 6.7	10	32.28	d
11-H_2	2.04	ddd	10, 12, 13	7.0; 7.4; 0.8	11	40.52	t
12-H	5.59	dd	11, 13	7.4; 14.9	12	132.84	d
13-H	6.00	bdd	12, 14	15.0; 10.5	13	131.12	d
14-H	6.21	ddd	13, 15, 16	10.4; 15.1; 0.8	14	132.11	d
15-H	5.53	dd	14, 16	15.2; 6.3	15	128.71	d
16-H	4.29	m			16	74.14	d
17-H	3.85	ddd	16, 18 a, 18 b	2.8; 2.9; 12.1	17	74.77*	d
18-H_a	1.36	dddd	17, 18 b, 19, 20	2.9; 14.5; 2.9; 1.3	18	26.88	t
18-H_b	1.84	ddd	17, 18 a, 19	12.0; 14.5; 2.9	18	26.88	t
19-H	3.97	ddd	18 a, 18 b, 20	2.9; 2.9; 2.8	19	70.21	d
19-OH	3.46	s			19	70.21	d
20-H	1.62	dddq	18 a, 19, 21, 27	1.2; 2.7; 2.5; 7.2	20	39.64	d
21-H	4.43	ddq	22, 23, 24	6.1; 1.2; 1.2	21	74.69*	d
22-H	5.45	ddd	21, 23, 24	6.2; 15.4; 1.6	22	130.23	d
23-H	5.69	ddq	21, 22, 24	1.2; 15.4; 6.5	23	126.82	d
24-H_3	1.69	ddd	21, 22, 23	1.1; 1.5; 6.5	24	17.92	q
25-H_3	1.79	d	9	1.3	25	20.37	q
26-H_3	0.94	d	10	6.6	26	20.89	q
27-H_3	0.88	d	20	7.2	28	11.14	q

*Die Werte können getauscht werden.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

GBF - Gesellschaft für
Biotechn. Forschung mbH
Mascheroder Weg 1

38124 Braunschweig

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: GBF - Gesellschaft für Biotechn. Forschung mbH Address: Mascheroder Weg 1 38124 Braunschweig	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 11071 Date of the deposit or the transfer[1]: 1996-07-08

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1996-07-08 [2].
On that date, the said microorganism was

(X)[3] viable

( )[3] no longer viable

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED[4]

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): U. Wehs Date: 1996-07-23

[1] Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
[2] In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
[3] Mark with a cross the applicable box.
[4] Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSMZ-BP/9 (sole page) 0196

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

GBF - Gesellschaft für
Biotechn. Forschung mbH
Mascheroder Weg 1

38124 Braunschweig

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
So ce477	DSM 11071

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I. above was accompanied by:

( ) a scientific description
(X) a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable).

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1996-07-08 (Date of the original deposit)[1].

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

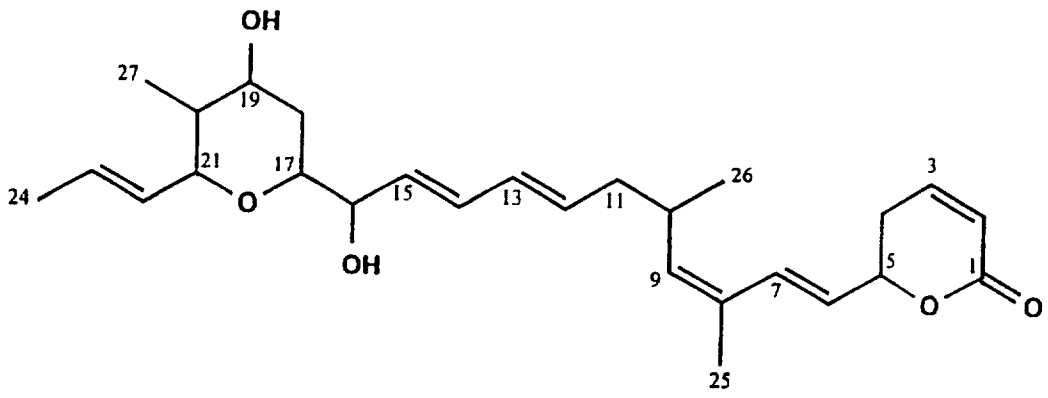
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): U. Werks
Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Date: 1996-07-23

[1] Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form DSMZ-BP/4 (sole page) 0196

PATENTANSPRÜCHE

1. Verbindung mit antibiotischer und antitumoraler Aktivität der Formel:



2. Verbindung (Ratjadon B) der Summenformel $C_{27}H_{38}O_5$ und mit den folgenden Parametern:

^1H- und ^{13}C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1,

UV-Spektrum (Methanol): $lambda_{max}$ (lg epsilon) = 229 (4,57) und 241 (sh; 4,52) nm,

IR-Spektrum (KBr): ny = 2964 (s), 2919 (s), 2880 (s), 1720 (vs), 1382 (s), 1249 (s), 1078 (s), 1058 (s), 1036 (s), 1013 (s), 991 (s) und 968 (s) cm^{-1}.

3. Verbindung mit antibiotischer und antitumoraler Aktivität, dadurch gewinnbar, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* Stamm So ce477 = DSM 11 071 in einem C- und N-Quellen sowie Mineralsalze enthaltenden wäßrigen Medium gegebenenfalls in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,

(b) Ratjadon B,

(b1) sofern ohne Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus den *Sorangium cellulosum*-Zellen und/oder dem Kulturmedium oder mit Essigsäureethylester extrahiert oder

(b2) sofern in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus dem Adsorberharz mit Methanol eluiert, das Eluat einengt und mit Essigsäureethylester extrahiert,

(c) den Essigester abzieht und den öligen Rückstand in Methanol löst,

(d) die methanolische Lösung über Kieselgel filtriert und mit Methanol eluiert,

(e) das methanolische Eluat einengt und an einer C_{18}-Umkehrphase einer HPLC-Chromatographie mit einem Methanol/Wasser-Gemisch als Laufmittel unterwirft,

(f) Fraktionen mit einem Gehalt an Ratjadon B (Detektion: 230 nm) sammelt und Ratjadon B isoliert.

4. Verbindung nach Anspruch 3, dadurch gewinnbar, daß man in Stufe (a) mit Amberlite^{R} XAD-16 als Adsorberharz arbeitet.

5. Verbindung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (e) mit Nucleosil^{R}-100 RP 18 chromatographiert.

6. Verfahren zur Gewinnung der Verbindung gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* Stamm So ce477 = DSM 11 071 in einem C- und N-Quellen sowie Mineralsalze enthaltenden wäßrigen Medium gegebenenfalls in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert,

(b) Ratjadon B,

(b1) sofern ohne Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus den *Sorangium cellulosum*-Zellen und/oder dem Kulturmedium mit Essigsäureethylester extrahiert oder

(b2) sofern in Gegenwart eines Adsorberharzes kultiviert wurde, aus dem Adsorberharz mit Methanol eluiert, das Eluat einengt und mit Essigsäureethylester extrahiert,

(c) den Essigester abzieht und den öligen Rückstand in Methanol löst,

(d) die methanolische Lösung über Kieselgel filtriert und mit Methanol eluiert,

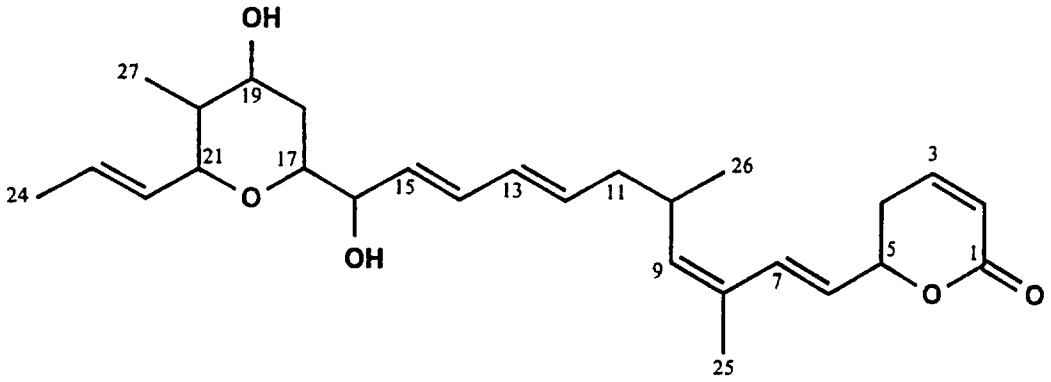
(e) das methanolische Eluat einengt und an einer C_{18}-Umkehrphase einer HPLC-Chromatographie mit einem Methanol/Wasser-Gemisch als Laufmittel unterwirft,

(f) Fraktionen mit einem Gehalt an Ratjadon B (Detektion: 230 nm) sammelt und Ratjadon B isoliert.

7. *Sorangium cellulosum* So ce477 = DSM 11 071.

8. Antibiotisches Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.

9. Antitumorales Mittel mit einem Gehalt an einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.



Ratjadon B $C_{27}H_{38}O_5$ (442)

Abb. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna al Application No
PCT/EP 97/04954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07D309/32 A61K31/35

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 C07D 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.
	-/--	

[X] 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	Date of mailing of the international search report
19 December 1997	16 January 1998 (16.01.98)

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Steendijk, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 97/04954

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 17, 23 October 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 222498, GERTH K ET AL: "Antibiotics from gliding bacteria. 69. Ratjadon: a new antifungal compound from Sorangium cellulosum (Myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties" XP002050938 cited in the application see abstract & J. ANTIBIOT. (JANTAJ,00218820);95; VOL.48 (9); PP.973-6, GESELLSCHAFT BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG;ABTEILUNG NATURSTOFFBIOLOGIE; BRAUNSCHWEIG; D-38124; GERMANY (DE), ---	1-9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 1, 3 July 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 005217, SCHUMMER D ET AL: "Antibiotics from gliding bacterial. LXIII. Ratjadone: a new antifungal metabolite from Sorangium cellulosum" XP002050939 cited in the application see abstract & LIEBIGS ANN. (LANAEM,09473440);95; (4); PP.685-8, GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH;ABTEILUNG NATURSTOFFCHEMIE; BRAUNSCHWEIG; D-38124; GERMANY (DE), ---	1-9
A	GERTH K ET AL: "THE JERANGOLIDS: A FAMILY OF NEW ANTIFUNGAL COMPOUNDS FROM SORANGIUM CELLULOSUM (MYXOBACTERIA) PRODUCTION, PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF JERANGOLID A" JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 49, no. 1, January 1996, pages 71-75, XP000655139 -----	1-9

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interna ales Aktenzeichen
PCT/EP 97/04954

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07D309/32 A61K31/35

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07D 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.
	-/--	

[X] 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

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
19.Dezember 1997	16. 01. 98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
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	Steendijk, M

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interna ...les Aktenzeichen
PCT/EP 97/04954

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 17, 23.Oktober 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 222498, GERTH K ET AL: "Antibiotics from gliding bacteria. 69. Ratjadon: a new antifungal compound from Sorangium cellulosum (Myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties" XP002050938 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung & J. ANTIBIOT. (JANTAJ,00218820);95; VOL.48 (9); PP.973-6, GESELLSCHAFT BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG;ABTEILUNG NATURSTOFFBIOLOGIE; BRAUNSCHWEIG; D-38124; GERMANY (DE), ---	1-9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 1, 3.Juli 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 005217, SCHUMMER D ET AL: "Antibiotics from gliding bacterial. LXIII. Ratjadone: a new antifungal metabolite from Sorangium cellulosum" XP002050939 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung & LIEBIGS ANN. (LANAEM,09473440);95; (4); PP.685-8, GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH;ABTEILUNG NATURSTOFFCHEMIE; BRAUNSCHWEIG; D-38124; GERMANY (DE), ---	1-9
A	GERTH K ET AL: "THE JERANGOLIDS: A FAMILY OF NEW ANTIFUNGAL COMPOUNDS FROM SORANGIUM CELLULOSUM (MYXOBACTERIA) PRODUCTION, PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF JERANGOLID A" JOURNAL OF ANTIBIOTICS, Bd. 49, Nr. 1, Januar 1996, Seiten 71-75, XP000655139 -----	1-9

1