



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 222 041 A1

4(51) C 12 P 15/00
C 12 P 19/56

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 260 724 8

(22) 09.03.84

(44) 08.05.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Wagner, Christina, Dipl.-Biol.; Ihn, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Fleck, Werner, Dr. habil. rer. nat.; Tresselt, Dieter, Dr. rer. nat.; Erritt, Inge, Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Herstellung neuer Anthracyclinon-Derivate

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung zweier neuer Anthracyclinon-Derivate auf mikrobiologischem Wege. Der zur Herstellung des neuen Bisanhydro-7-hydroxy- γ -rhodomycinons (1 PI) und des neuen Bisanhydro-7-hydroxy- ϵ -rhodomycinons (1 PII) verwendete Mikroorganismus ist eine Antibiotika-geblockte Mutante der Art *Streptomyces griseus* und trägt die Bezeichnung ZIMET 43 707. Ziel der Erfindung ist die ökonomische Herstellung der neuen Bisanhydro-7-hydroxy-rhodomycinone 1 PI und 1 PII. Diese Substanzen können als potentielle Ausgangsprodukte für Mutasynthesen bzw. Biokonversion dienen, die zu neuen Anthracyclin-Antibiotika führen, die bei der Chemotherapie von Tumor-, Virus- und von Bakterien hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Nutztier von potentiellern Nutzen sind sowie als potentielle Enzyminhibitoren zur gezielten Steuerung von Anthracyclinbiosynthese-Prozessen eingesetzt werden können. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des Stammes ZIMET 43 707 der Art *Streptomyces griseus* in Medien mit geeigneten C-, N-Quellen und Mineralsalzen die Bisanhydro-7-hydroxy-rhodomycinone 1 PI und 1 PII gebildet, mit geeigneten Methoden aus dem Kulturfiltrat isoliert und nachfolgend getrennt und gereinigt werden.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung neuer Anthracyclon-Derivate, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine Antibiotika-geblockte Mutante der Art *Streptomyces griseus*, Stamm ZIMET 43707, unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die Kohlenstoff-, Stickstoff-Quellen sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur von 25 bis 37°C, während eines Zeitraumes von 2 bis 6 Tagen, kultiviert und die gebildeten neuen Anthracyclon-Derivate, Bisanhydro-7-hydroxy- γ -rhodomycinon (1 PI) und Bisanhydro-7-hydroxy- ϵ -rhodomycinon (1 PII), aus dem Kulturfiltrat bei einer Acidität von pH3 bis pH9.5, mittels üblicher Lösungsmittel extrahiert, nachfolgend mit üblichen Methoden konzentriert, ausgefällt und chromatographisch getrennt und gereinigt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Fermentationsprozeß bei 28°C während einer Zeitdauer von 4 Tagen durchgeführt wird.

Hierzu 1 Seite Formeln

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung zweier neuer Anthracyclon-Derivate auf mikrobiologischem Wege. Die Anthracyclon-Derivate können als potentielle Ausgangsprodukte für Mutasynthese bzw. Biokonversion dienen, die zu neuen Anthracyclin-Antibiotika führen, die bei der Chemotherapie von Tumor-, Virus- und von Bakterien hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Nutztier von potentiellern Nutzen sind sowie als potentielle Enzyminhibitoren zur gezielten Steuerung von Anthracyclonbiosynthese-Prozessen eingesetzt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Ein Verfahren zur Herstellung von Anthracyclon-Derivaten vom Bisanhydro-7-hydroxy-rhodomycinon-Typ auf mikrobiologischem Wege ist bisher nicht bekannt. Bisher wurden lediglich zwei strukturell ähnliche Anthracyclon-Derivate (Bisanhydro-7-hydroxyaklavinone) in Kulturbrühen von zwei Mutanten des Aclacinomycin-Bildners *Streptomyces galileus* MA 144-M1 gefunden (Tobe, M. et al., 1982. J. Antibiot., **35**, 1641-1645).

Als Ausgangssubstanzen für Muta- bzw. Biosynthesen von Anthracyclin-Antibiotika sind bisher Anthracyclonone (Yoshimoto, A. et al., 1980. J. Antibiot., **33**, 1150-1157; Oki, T. et al., 1980. J. Antibiot., **33**, 1331-1340; Yoshimoto, A. et al., 1980. J. Antibiot., **34**, 1492-1494, Eur. Pat. appl. EP 62,327, 13 Oct 1982) bzw. Anthracycline (Arcamone, F.: Doxorubicin. Acad. Press, New York 1981) eingesetzt worden.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat die ökonomisch günstige Herstellung der beschriebenen neuen Anthracyclon-Derivate zum Ziel.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung neuer Anthracyclon-Derivate zu beschreiben.

Überraschend wurde gefunden, daß ein durch Mutagenese aus einer Population des *Streptomyces griseus* JA5570 selektierter Antibiotika-geblockter Mikroorganismus es gestattet, Bisanhydro-7-hydroxy-rhodomycinone in guten Ausbeuten aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen herzustellen.

Unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen wird in einem flüssigen Nährmedium mit entsprechenden Kohlenstoff-, Stickstoffquellen und Mineralsalzen der genetisch modifizierte Mikroorganismus oder seine Varianten gezüchtet. Der Mikroorganismus, der in diesem Verfahren Anwendung findet, ist unter der Registriernummer ZIMET 43707 in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW der DDR, 6900 Jena, Beutenbergstr. 11 hinterlegt worden.

Die Kultivierung des Stammes 43707 sowie seiner Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. An Glucose/Gelatine (5%ig) lyophilisierte Mycelfragmente werden auf geeignete Agarnährböden und nachfolgend in flüssige, vorher sterilisierte Nährmedien geimpft, und das entstandene Mycel wird in an sich bekannter Weise bei einer Temperatur zwischen 25 und 37°C, vorzugsweise 28°C, über einen Zeitraum von 2 bis 6 Tagen, vorzugsweise 4 Tagen, bei einer Acidität kultiviert, die zu Beginn des Fermentationsprozesses zwischen pH6.2 und pH7.0 und am Ende des Prozesses zwischen pH7.5 und pH8.3 liegt. Das Nährmedium besteht aus Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie aus anorganischen Salzen. Als Kohlenstoffquellen können Stärke, Glucose, Glycerin, Dextrin, Mannit, Saccharose, Sojaöl und Sojamehl verwendet werden. Als Stickstoffquellen kommen außer den o.g. 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 Kalziumkarbonat, Natriumphosphat bzw. Kaliumphosphat als vorteilhaft erwiesen. Die Isolierung der Bisanhydro-7-hydroxy-rhodomycinone wird in der Weise durchgeführt, daß die Substanzen mit organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Butanol, aus dem Kulturfiltrat extrahiert, nach Konzentrieren mit Wasser versetzt, durch Zugabe von organischen mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln erneut extrahiert und aus dem Extraktkonzentrat durch Zugabe von Petroläther ausgefällt werden. Durch Abfiltrieren und Waschen mit Petroläther wird ein Rohprodukt erhalten, aus dem diese Anthracyclon-Derivate säulenchromatographisch getrennt und weiter gereinigt werden können.

Die auf diese Weise isolierten reinen Bisanhydro-7-hydroxyrhodomycinone kristallisieren aus Benzol in braunroten Kristallen, die sich in Benzol, Chloroform, Aceton mäßig und in Cyclohexan, Petroläther sehr schwer lösen.

Bisanhydro-7-hydroxy- γ -rhodomycinon (1 PI):

Die Substanz 1 PI schmilzt bei 246 bis 248°C unter Zersetzung. Die Substanz hat die Summenformel $C_{20}H_{14}O_6$ (MG = 350) und die in Abb. 1 gezeigte Struktur.

Die Adsorptionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich liegen bei (λ_{max} [e] in Chloroform) 560 (44211); 520 (38316); 484 (18053) nm und bei (λ_{max} [e] in Dimethylformamid) 610 (22380); 574 (20529) nm. IR-Spektrum (KBr): 1600 cm^{-1} (Chinoncarbonylchel.).

Massenspektrum: m/z M⁺ 350,0803 (C₂₀H₁₄O₆); 335,0549 (M⁺-CH₃); 321,0734 (M⁺-CHO); 307,0549 (M⁺-CO-CH₃).

¹H-NMR-Spektrum: Siehe Tab. 1.

Dünnschichtchromatographisches Verhalten: DC-Alufolie-Kieselgel 60, (Laufmittel Benzol: Rf-Wert 0,42; Laufmittel Chloroform: Rf-Wert 0,56. DC-Alufolie-Kieselgel 60) getränkt in 0,5n Oxalsäure und an der Luft getrocknet, Laufmittel Benzol: Rf-Wert 0,70; Laufmittel Chloroform: Rf-Wert 0,82.

Bisanhydro-7-hydroxy-ε-rhodomyconin (1 PII):

Die Substanz 1 PII schmilzt bei 260 bis 265°C unter Zersetzung. Die Substanz hat die Summenformel C₂₂H₁₆O₈ (MG 408) und die in Abb. 2 gezeigte Struktur.

Die Adsorptionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich liegen bei (λ_{max} (ε) in Chloroform 565 (41586); 525 (35592); 488 (16859) nm und bei (λ_{max} (ε) in Dimethylformamid 628 (25513); 584 (21772) nm. IR-Spektrum (KBr): 1600 cm⁻¹ (Chinoncarbonyl); 1735 cm⁻¹ (CO-Ester) Massenspektrum: m/z M⁺ 408,0839 (C₂₂H₁₆O₈); 376,0583 (M⁺-CH₃OH); 350,0796 (M⁺-CH₂COO); 334,0762 (M⁺-C₂H₂O₃); 307,0594 (M⁺-CH₂COOCH₃-CO).

¹H-NMR-Spektrum: Siehe Tab. 1

Dünnschichtchromatographisches Verhalten: DC-Alufolie-Kieselgel 60, Laufmittel Benzol: Rf-Wert 0,18; Laufmittel Chloroform: Rf-Wert 0,46. DC-Alufolie Kieselgel 60 getränkt in 0,5n Oxalsäure und getrocknet an der Luft, Laufmittel Benzol: Rf-Wert 0,29, Laufmittel Chloroform: Rf-Wert 0,75.

Diese Bisanhydro-7-hydroxy-rhodomyconone können als Ausgangsprodukte für Muta- bzw. Biosynthesen von Anthracyclin-Antibiotika sowie als potentielle Enzyminhibitoren für gezielte Steuerung von Anthracyclinbiosynthese-Prozessen verwendet werden.

Ausführungsbeispiele

Anhand eines Ausführungsbeispiels soll die Erfindung näher erläutert werden.

a) Zwei 500 ml-Steilbrustflaschen enthalten je 80 ml des folgenden Vorzucht-Mediums:

Glukose	1,50 %
Sojamehl	1,50 %
Natriumchlorid	0,50 %
Calciumkarbonat	0,10 %
primäres Kaliumphosphat in Leitungswasser	0,03 %

Sterilisierung: 35 Min. bei 110°C. Nach der Sterilisierung liegt die Acidität bei pH 6,3.

Jede Steilbrustflasche wird mit einer Mycelsuspension beimpft, welche mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung von einer im Reagenzglas auf folgendem Anzucht-Nährboden gezüchteten 10-14 Tage alten Kultur des Stammes ZIMET 43707 hergestellt wird:

Saccharose	0,300 %
Dextrin	1,500 %
Harnstoff	0,010 %
Hefeextrakt	0,100 %
Pepton (bakt.)	0,500 %
Natriumchlorid	0,050 %
Eisensulfat	0,001 %
primäres Kalium-Phosphat	0,050 %
Agar-Agar (gewaschen) in Aqua destillata	2,000 %

Sterilisierung: 40 Min. bei 116°C. Nach der Sterilisierung liegt die Acidität zwischen pH 6,5 und pH 7,0.

Bei beimpften Vorzucht-Kulturen wird 48 Stunden bei 28°C auf einem Schütteltisch mit einer Frequenz von 180 U/Min. bebrütet. 8 ml einer so bebrüteten Vorzucht-Kultur dienen zur Beimpfung von 500 ml-Steilbrustflaschen, die je 80 ml des folgenden Produktions-Mediums enthalten:

Glukose	2,0 %
Sojamehl	2,0 %
Natriumchlorid	0,5 %
Calciumkarbonat	
in Leitungswasser	0,3 %

Sterilisierung: 35 Min. bei 110°C. Die Acidität beträgt nach dem Sterilisieren pH 6,3.

Die Temperatur während der Fermentation liegt bei 28°C und die Schüttelfrequenz bei 180 U/Min. Nach 72 bis 96stündiger Fermentation wird die höchste Ausbeute an den Bisanhydro-7-hydroxy-rhodomycononen erreicht.

b) Man verfährt wie im Verfahrensteil A mit dem Unterschied, daß das Produktions-Medium folgende Zusammensetzung hat:

Glukose	3,000 %
Sojamehl	3,000 %
Calciumkarbonat	0,300 %
Natriumchlorid	0,300 %
Eisenchloridhydrat	
in Leitungswasser	0,025 %

Sterilisierung: 35 Min. bei 110°C. Die Acidität liegt nach der Sterilisierung bei pH 6,5.

c) Man geht wie in B) vor mit dem Unterschied, daß der Anzucht-Agar, das Vorzucht- und das Produktions-Medium folgende Zusammensetzung haben:

Anzucht-Agar	
Saccharose	2,0 %
Trockenhefe	0,1 %

Natriumnitrat	0,2 %
Magnesiumsulfat	0,2 %
sekundäres Kaliumphosphat	0,2 %
Agar-Agar in Leitungswasser	1,5 %

Sterilisierung: 40 Min. bei 116°C. Die Acidität liegt nach dem Sterilisieren bei pH7,0.

Vorzucht-Medium

Bacto-Pepton	0,60 %
Trockenhefe	0,30 %
Calciumnitratthydrat in Leitungswasser	0,05 %

Sterilisierung: 30 Min. bei 120°C, pH7,2 nach Sterilisieren.

Produktions-Medium

Glukose	4,000 %
Trockenhefe	1,500 %
Natriumchlorid	0,200 %
Calciumkarbonat	0,100 %
sek. Kaliumphosphat	0,100 %
Magnesiumsulfat	0,010 %
Eisensulfat	0,001 %
Zinksulfat	0,001 %
Kupfersulfat in Leitungsw.	0,001 %

Sterilisierung: 30 Min. bei 120°C. Glukose wird separat 20 Min. bei 110°C sterilisiert. Die Acidität liegt danach bei pH7,0.

- d) Man verfährt wie im Teil C) mit dem Unterschied, daß das Vorzucht- und Produktions-Medium folgende Zusammensetzung aufweist:

Vorzucht-Medium

Dextrin	3,00 %
Maisquellwasser	0,40 %
Calciumkarbonat	0,30 %
Ammoniumsulfat	0,10 %
Casein	0,50 %
sek. Kaliumphosphat in Leitungswasser	0,01 %

Sterilisierung: 35 Min. bei 120°C. Acidität nach dem Sterilisieren: pH7,0.

Produktions-Medium

Dextrin	3,00 %
Calciumkarbonat	0,60 %
Maisquellwasser	0,80 %
Casein	0,50 %
Ammoniumsulfat	0,10 %
sek. Kaliumphosphat in Leitungswasser	0,01 %

Sterilisierung: 35 Min. bei 120°C. Acidität nach dem Sterilisieren: pH7,0.

- e) Das Verfahren unterscheidet sich von demjenigen des Teiles B) dadurch, daß die zu beimpfende Kultur auf folgendem halbfestem Nährboden entwickelt wird:

Hafermehl	2,0 %
Agar-Agar (gewaschen) in Aqua destillata	2,0 %

Die Sterilisierung wird in üblicher Weise durchgeführt und die Acidität liegt bei 7,0 pH. Anschließend beimpft man das in Beispiel B) beschriebene Vorzucht-Medium und mit dem so erhaltenen Impfmateriale werden 500 ml-Steilbrustflaschen beimpft, die 80 ml des wie folgt zusammengesetzten Produktions-Nährmediums enthalten:

Glukose	1,0 %
Kartoffelstärke	1,0 %
Sojamehl	1,0 %
Trockenhefe	0,5 %
Natriumchlorid	0,5 %
Calciumkarbonat in Leitungswasser	0,3 %

Sterilisierung: 40 Min. bei 110°C. Nach dem Sterilisieren liegt die Acidität bei pH7,0.

- f) Mit einer Kultur des Stammes ZIMET 43707 von einem halbfesten Nährboden, wie im Teil E) beschrieben, beimpft man 400 ml des im Teil A) angeführten flüssigen Vorzucht-Mediums, welches in einem 2-l-Glaskolben enthalten ist. Man bebrütet 48 Std. bei 28°C auf einem Schüttelgerät mit einer Frequenz von 180 U/Min. Die so erhaltenen 400 ml Kulturbrühe dienen zur Beimpfung von 20 l des im Teil A) beschriebenen Produktions-Mediums, das in einem 32-l-Glasfermenter enthalten ist. Während der Fermentation, die mit einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/Min. und mit einer Luftzufuhr von 15 l je Min. ausgeführt werden kann, wird die Schaumbildung durch Zusatz kleiner Mengen von Sonnenblumenöl oder anderer silikonhaltiger Schaumschutzmittel kontrolliert. 40 l Kulturflüssigkeit, die man durch Vereinigen von 2 Fermentationsansätzen im 32 l Glasfermenter erhielt, wurden zentrifugiert und das Kulturfiltrat 3 mal mit je 4 l Butanol ausgerührt. Die abgetrennten Butanolphasen wurden vereinigt, mit verdünnter Salzsäure auf pH5 eingestellt, im Vakuum konzentriert, mit der 10fachen Menge Petroläther versetzt und vom hierbei ausgefallenen Pigment-Rohprodukt abgesaugt. Das Rohprodukt wird in Chloroform gelöst, mit Wasser gewaschen, die Chloroformphase abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum konzentriert und die beiden

Anthracyclinonderivate 1PI und 1PII durch einmalige Säulenchromatographie an Oxalsäure-gepuffertem Kieselgel mit Chloroform/Aceton=95/5 von anderen polaren Pigmenten abgetrennt. Die Trennung des 1PI und 1PII Anthracyclinonderivat-Gemisches erfolgte durch einmalige Säulenchromatographie an Oxalsäure-gepuffertem Kieselgel 60 mit Benzol. Die Ausbeuten an den reinen kristallinen Substanzen — bezogen auf 1l Kulturflüssigkeit — betragen:

1 PI (Bisanhydro-7-hydroxy- γ -rhodomycinon) 32 mg und

1 PII (Bisanhydro-7-hydroxy- ϵ -rhodomycinon) 65 mg.

Tabelle 1 $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Bisanhydro-7-hydroxy- γ -rhodomycinon (1PI) und Bisanhydro-7-hydroxy- ϵ -rhodomycinon (1PII)
Meßfrequenz: 200 MHz, Lösungsmittel: CDCl_3 . Die chemischen Verschiebungen wurden auf Tetramethylsilan als inneren Standard bezogen.

Proton	1 PI	1 PII
1-H:	7,98 Q (A)	8,00 Q (A)
2-H:	7,69 T (M)	7,69 T (M)
3-H:	ca. 7,25 Q ^{a)} (X) $J_{AM} = 8,0 \text{ Hz}$ $J_{AX} = 1,5 \text{ Hz}$ $J_{MX} = 8,0 \text{ Hz}$	ca. 7,23 Q ^{a)} (X) $J_{AM} = 8,0 \text{ Hz}$ $J_{AX} = 1,5 \text{ Hz}$ $J_{MX} = 8,0 \text{ Hz}$
8-H	7,10 D (A)	7,17 S
10-H	7,82 D (X) $J_{AX} = 2,4 \text{ Hz}$	—
COOCH_3 :	—	4,00 S
CH_2 von C_2H_5 :	2,78 Q (A)	2,69 Q (A)
CH_3 von C_2H_5 :	1,31 D (X) $J_{AX} = 7,5 \text{ Hz}$	1,28 D (X) $J_{AX} = 7,5 \text{ Hz}$
4-OH:	16,34 S, v	16,28 S, v
6-OH:	15,39 S	15,10 S
7-OH:	11,01 S	11,77 S
11-OH:	10,79 S	10,27 S

a) Signal wird vom Chloroform-Restsignal überlagert.

S, Singulett; D, Dublett; T, Triplett; Q, Quartett; v, Signal verbreitert.

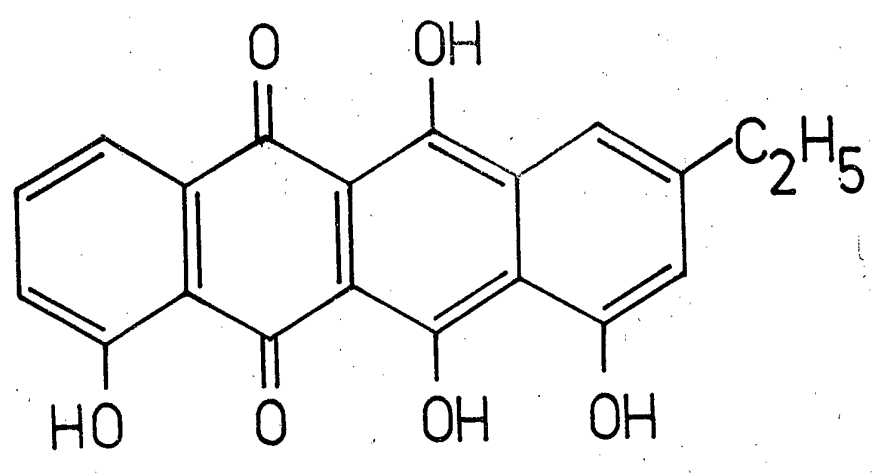


Abb. I

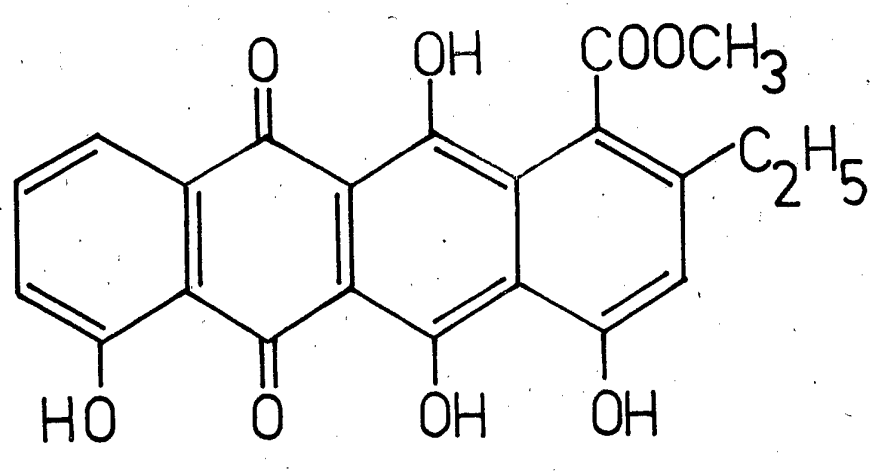


Abb. II