



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

205 696

Int.Cl.³

3(51) C 12 P 17/06

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 241 039 8

(22) 24.06.82

(44) 04.01.84

(71) ADW DER DDR, BERLIN, DD

(72) IHN, WOLFGANG, DR. RER. NAT.; SCHLEGEL, BRIGITTE, DIPL.-BIOL.;
FLECK, WERNER, DR. HABIL. RER. NAT. DIPL.-BIOL.; GUTSCHE, WALTER, DR. RER. NAT. DIPL.-BIOL.; DD;

(73) siehe (72)

(74) HULTSCH, ERICH INST. U. EINRICHTUNGEN JENA D. ADW DER DDR 6900 JENA
BEUTENBERGSTR. 11

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES ANTHRACYCLIN-ANTIBIOTICUMS SOWIE SEINES AGLYKONS

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Anthracyclin-Antibioticums sowie seines Aglykons, die für die Chemotherapie von Tumor-, Virus- und durch Bakterien hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Nutztier von potentielltem Nutzen sind. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des bisher nicht verfügbaren Antibioticums Beta-Rhodomycin I, seiner Salze sowie seiner hydrolytischen Abbauprodukte unter Verwendung eines neuen Mikroorganismus, der nach interspezifischer Rekombination erhalten und als **Streptomyces violaceus subsp. iremyceticus**, Stamm ZIMET 43678, bezeichnet wurde. Ziel der Erfindung ist die Gewinnung eines Anthracyclin-Antibioticums mit potentiell cancerostatischen Eigenschaften sowie seiner hydrolytischen Abbauprodukte als Ausgangssubstrate für Mutasyntese und Halbsyntese, um die Palette derartiger Pharmaka zu erweitern. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des neuen Mikroorganismus ZIMET 43678 in Medien mit geeigneten C-, N-Quellen und Mineralsalzen Beta-Rhodomycin I gebildet, mit geeigneten Methoden aus Mycel und Kulturfiltrat isoliert und nachfolgend gereinigt und gegebenenfalls hydrolisiert wird.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung eines Anthracyclin-Antibioticums sowie seines Aglykons

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 potentiellen Nutzen sind. Insbesondere betrifft die Erfindung die Gewinnung eines neuen Anthracyclin-Antibioticums, das als Beta-Rhodomycin I bezeichnet wird, seiner Salze, sowie seines Aglykons.

Charakteristik der bekannten technischen Lösung

Anthracyclinon-Glykoside stellen antibiotisch wirksame Verbindungen dar, deren chromophorer Molekülteil ein 7,8,9,10-tetrahydrotetracenchinon (5,12) darstellt, das mit Zuckern, bevorzugt Aminozuckern, verbunden ist (Brockmann, H., 1963. Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe, 21, 121). Je nach Stellung der peri-ständigen OH-Gruppen am Aglykon werden verschiedene Anthracyclinone unterschieden, die als Glykoside die Bezeichnung Anthracycline tragen und nur in dieser Form biologisch aktiv sind. Mehr als 50 Anthracyclin-Antibiotica sind bisher beschrieben, wovon die Mehrzahl Gemische von schwer voneinander trennbaren Einzelkomponenten darstellen. 2 Anthracyclin-Antibiotica (Doxorubicin-US Patent 3 590 028; Daunorubicin-GB-Patent 1 003 383) sind auf Grund ihrer chemotherapeutischen Wirksamkeit gegen akute Leukämien und solide Tumoren des Menschen bereits klinisch eingesetzt. Ein

wesentliches Problem bei der krebschemotherapeutischen Anwendung von Anthracyclin-Antibiotica resultiert aus deren allgemeiner, hämatologischer, digestiver und kardialer Toxizität, die eine umfassendere Anwendung in der Tumorchemotherapie einschränkt und z. B. bei Herzkranken zur Kontraindikation führt. Da sich die Herztoxizität der Anthracycline als besonders störend erwiesen hat, werden ständig neue Derivate bereits bekannter Verbindungen hergestellt und hinsichtlich einer verringerten Toxizität untersucht. Ein Nachteil ist, daß zur Gewinnung chemisch modifizierter Anthracyclin-Antibiotica zwar chemische Methoden wie Total- und Partialsynthese sowie biochemische Methoden zur enzymatischen Konversion verfügbar sind, deren Anwendung jedoch zu einer unzureichenden Ökonomie der Produktherstellung führt, die eine großtechnische Herstellung dieser Derivate nicht gestattet. Bei den bisher bekannten mikrobiologischen Herstellungsverfahren für Anthracyclin-Antibiotica werden bevorzugt Gemische chemisch ähnlicher Anthracycline gewonnen, die aus den Mono-, Di-, Tri- oder Polysacchariden unterschiedlicher und bisher unter großtechnischen Bedingungen praktisch nicht trennbarer Aglykone (Anthracyclinone) bestehen. Das bringt Standardisierungsprobleme für das Endprodukt mit sich, wenn in Abhängigkeit vom Fermentationsverlauf Verschiebungen qualitativer und quantitativer Art im Vielkomponenten-Gemisch auftreten.

Anthracyclinon-Glykoside, deren Aglykone dem beta-Rhodomycinon zugeordnet werden können, sind bisher lediglich mit Hilfe der Arten Streptomyces purpurascens (Brockmann, Waehnelde und Niemeyer, 1969. *Tetrahedr. Lett.*, (6), 415; Brockmann, Scheffer und Stein, 1973. *Tetrahedr. Lett.*, (38), 3699; Brockmann und Greve, 1975. *Tetrahedr. Lett.*, (11), 831), Streptomyces bobiliae (Biedermann und Bräuninger, 1972. *Pharmazie*, 27, 782), Streptomyces griseoruber 4620 (Podojil, Blumauerová, Prikrylova, Vanek, Gauze und Maksimova, 1980. *Folia Microbiol.*, 25, 464), Streptomyces violaceus (Fleck, Strauß, Koch, Kramer und Prauser, 1974. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 14, 551), Streptomyces roseoviolaceus A 529 (IFO 13081) (Oki, Yoshimoto und Matsuzawa, 1980. *J. Antib.*, 33, 1331)

auf fermentativem Wege sowie durch Biosynthese und Glykosidierung von beta-Rhodomycinon mittels einer Aclacinomycin-Mangelmutante als Gemische oder als Minorkomponenten mit unbekannter chemotherapeutischer Aktivität erhalten worden. Die beta-Rhodomycinon-Glykoside, die bisher beschrieben wurden, sind im Zusammenhang mit der Gewinnung und Strukturaufklärung des biologisch inaktiven beta-Rhodomycinons in sehr geringen Mengen isoliert worden. Angaben zu den physikochemischen Eigenschaften der beta-Rhodomycinon-Glykoside sind nicht oder nur unvollständig vorhanden. Angaben zur biologischen Wirkung der Einzelkomponenten wie antimikrobielle, antivirale, cyto-statische und cancerostatische bzw. toxische liegen bisher nicht vor.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung dient der Herstellung eines neuen Anthracyclin-Antibioticums sowie seines Aglykons wie auch der Salze des Antibioticums, um die aufgeführten Nachteile bisher bekannter Verfahren zu vermeiden und die Palette potentiell cancerostatisch, virostatisch und antimikrobiell wirksamer Anthracycline durch einen Vertreter, der eine Einzelkomponente darstellt, zu erweitern, sowie um die hydrolytischen Abbau-produkte als Ausgangssubstrat für die Mutasynthese und Halbsynthese neuer Anthracyclin-Antibiotica verwenden zu können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein technologisch einfaches Verfahren anzugeben, das es gestattet, das neue Anthracyclin-Antibioticum Beta-Rhodomycin I mit Hilfe eines Mikroorganismus aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen in guten Ausbeuten herzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen in einem flüssigen Nährmedium mit entsprechenden Kohlenstoff-, Stickstoff-Quellen und Mineralsalzen ein neuer Mikroorganismus oder seine Varianten gezüchtet werden. Der neue Mikroorganismus,

der in diesem Verfahren Anwendung findet, wurde durch interspezifische Hybridisierung von genetisch markierten und im Sekundärstoffwechsel geblockten Mutanten des Violamycin-Bildners, Streptomyces violaceus, Stamm IMET JA 6844 (beschrieben in der DDR-Patentschrift 100 494) und des Turimycin-Bildners, Streptomyces hygrosopicus, Stamm IMET JA 6599 (beschrieben in der DDR-Patentschrift 84 450) gewonnen und in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Jena-DDR, unter der Nummer ZIMET 43 678 deponiert. In seinen morphologischen Eigenschaften entspricht der Beta-Rhodomyacin I-Bildner ZIMET 43 678 dem Stamm ZIMET 43 615, der in der DDR-Patentschrift 140 672 sowie von Schlegel und Fleck 1980 (Z. Allg. Mikrobiol., 20, 527 bis 530) als Streptomyces violaceus subsp. iremyceticus beschrieben wurde.

Danach gehört der Beta-Rhodomyacin I-Bildner ZIMET 43 678 zur Gattung Streptomyces und entspricht der Diagnose von Streptomyces violaceus (Rossi-Doria 1891, Krassilnikov 1941, Waksman 1953) wie sie nach Untersuchung des Neo-Type-Stammes ISP 5082 (= INMI-1, RIA 656, ATCC 15 888) im "International Streptomyces Project" von Shirling and Gottlieb (Int. J. syst. Bact., 19, 497/1969) gegeben wird. Der Beta-Rhodomyacin I-Bildner ZIMET 43 678 ist durch Selektionsprozesse aus einer Population der interspezifischen Rekombinante ZIMET 43 615 hervorgegangen und unterscheidet sich von der Ausgangsrekombinate in der Bildung von Anthracyclin-Antibiotica. Während die Ausgangsrekombinante ZIMET 43 615 das Anthracyclin-Antibioticum Iremycin (= 10- α -L-rhodosaminyloxy-rhodomycinon (DDR-Patentschrift 140 672) bildet, wird durch die selektierte Mutante ZIMET 43 678 das Anthracyclin-Antibioticum Beta-Rhodomyacin I synthetisiert.

Die Kultivierung des Stammes ZIMET 43 678 sowie seiner Mutanten und Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. An Erde lyophil getrocknetes Sporenmateriel bzw. Mycelfragmente werden in geeignete Agarnährböden und nachfolgend in flüssige, vorher sterilisierte Nährmedien geimpft und das entstehende Mycel wird in an sich bekannter Weise bei einer Temperatur zwischen 25 und 37 °C (vorzugsweise 28 °C) über einen Zeit-

raum von 2 bis 6 Tagen, vorzugsweise 4 Tagen, 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, Glycerin, 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 Kalziumkarbonat, Na-Phosphat bzw. Kalium-Phosphat als vorteilhaft erwiesen. Die Fermentation des Bildners ZIMET 43 678 kann in Steilbrustflaschen und Rundkolben verschiedenen Inhalts, im Glasfermenter sowie in V2A-Stahltanks durchgeführt werden.

Die Isolierung des Beta-Rhodomyacin-I wird in der Weise durchgeführt, daß das Antibioticum aus dem Kulturfiltrat mit organischen, mit Wasser nicht oder nur wenig mischbaren, und aus dem Mycel mit organischen, mit Wasser mischbaren und anschließend mit Wasser nicht oder nur wenig 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, durch Versetzen mit Petroläther unter Rühren ausgefällt, vom Lösungsmittel durch Filtration befreit, mit Petroläther gewaschen, nachfolgend getrocknet, anschließend in niederen Alkoholen gelöst, der getrocknete Rückstand mit Wasser versetzt und bei pH 8,0 mit Chloroform extrahiert, die Chloroformphase abgetrennt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne gebracht und auf üblichem Wege säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt wird.

Beta-Rhodomyacin I ist eine rotbraune, aus Chloroform/Petroläther auskristallisierende Substanz, die sich gut in nie-

deren Alkoholen und Chloroform, dagegen nur mäßig in Wasser und Petroläther löst. Das basische Antibioticum besitzt Indikator-eigenschaften und ist in sauren Lösungen rotgelb, in alkalischen blauviolett. Aus dem hochaufgelösten Massenspektrum erhält man für das Molekülion M^+ :m/z 543,2124 und damit die Summenformel $C_{28}H_{33}NO_{10}$ (theoretisch: 543,2104).

Beta-Rhodomyacin I bildet bei der Umsetzung mit einer äquivalenten Menge methanolischer Salzsäure in Chloroform/Äther ein kristallines Hydrochlorid mit der Summenformel $C_{28}H_{33}NO_{10} \cdot HCl$ und einem Fp. von 179 bis 181 °C. Das Hydrochlorid ist im Gegensatz zum basischen Antibioticum gut löslich in Wasser, dagegen nahezu unlöslich in Chloroform und Äther. Sowohl das basische Antibioticum als auch sein Hydrochlorid stellen entsprechend ihres dünn-schichtchromatographischen Verhaltens auf Kieselgel-Platten in verschiedenen Fließsystemen und bei unterschiedlichen pH-Werten definierte, chemisch reine Einzelkomponenten dar.

Bei Hydrolyse mit verdünnter Säure in der Wärme liefert das Anthracyclin-Antibioticum ein wasserunlösliches Aglykon und eine wasserlösliche Zuckerkomponente. Durch vergleichende dünn-schichtchromatographische und verschiedene spektroskopische Untersuchungen (UV/VIS-, IR-, MS-, 1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie) konnte das Aglykon als Beta-Rhodomyacinon (Brockmann und Franck, 1955. Chem. Ber., 88, 1792) und die Zuckerkomponente als L-Rhodosamin (Brockmann, Spohler und Waehneltdt, 1963. Chem. Ber., 96, 2925) identifiziert werden, so daß es sich bei dem hergestellten Beta-Rhodomyacin I um ein Rhodosaminyl-beta-rhodomyacinon handelt.

Die in Abb. 1 dargestellte Struktur des Antibioticums Beta-Rhodomyacin I wurde durch säurehydrolytischen Abbau und Identifizierung der Abbauprodukte sowie durch umfassende spektroskopische Untersuchungen am intakten Antibioticum-Molekül als 7-(α -L-Rhodosaminyl)-beta-rhodomyacinon gesichert und ist möglicherweise mit dem in der Literatur beschriebenen Rhodomyacin B (Beta-Rhodomyacin I) (Brockmann und Patt, 1955. Chem. Ber., 88, 1455) identisch. Spektros-

kopische Daten zum Rhodomycin B liegen bisher in der Literatur nicht vor.

Wichtige physicochemische Parameter des Beta-Rhodomycin I sowie seines Aglykons sind:

UV/VIS λ max (Cyclohexan/Chloroform) nm: 234,255,294,471,488,
500,516,534

IR KBr cm^{-1} : 3450(OH); 2770,2817(N(CH₃)₂); 1597 (H...CO
max Chinon)

MS m/z : M⁺ 543 (C₂₈H₃₃NO₁₀); 386⁺ (Aglykon, C₂₀H₁₈O₈)
175⁺ (Zucker, C₈H₁₇NO₃) 158⁺ (Zucker -OH, C₈H₁₆-
NO₂)

¹H-NMR (CDCl₃ δ): 7,90 dd (J=7,3 und 1,8 Hz, H-1); 7,70 t
(J=7,3 Hz, H-2)
7,31 dd (J=7,3 und 1,8 Hz, H-3); 4,91 s
(H-10);
5,17 mt (W 7 Hz, H-7); 1,40 d (J=6,1 Hz, 3H,
6'-Me);
2,23 s (6H, 3'-Nme); 5,51 mt (W-6 Hz, H-1');
¹J_{C,H} = 171,9 Hz, H, C-1' (α -Glykos.)

¹³C (CDCl₃):

C-Atom-Nr. Chem.Verschiebung (ppm) C-Atom-Nr. Chem.Versch.
(ppm)

1	119,7	4a	115,4
2	137,1	5a	112,5
3	125,1	6a	135,0
4	162,7	10a	138,5
5	190,9	11a	111,5
6	156,7	12a	133,3
7	70,8	1'	101,4
8	30,4	2'	28,7
9	71,9	3'	59,5
10	65,9	4'	66,7
11	157,2	5'	66,7
12	186,4	6'	17,0

241039 8 - 8 -

^{13}C (CDCl_3):

C-Atom-Nr. Chem.Verschiebung (ppm) C-Atom-Nr. Chem.Versch.
(ppm)

13	32,9	NMe ₂	42,0
14	6,5		

Sowohl frische Fermentationslösungen des Beta-Rhodomycin I-Bildners, ZIMET 43 678, als auch das aus ihnen isolierte Beta-Rhodomycin I besitzen antibiotische Aktivität. Wie typisch für die bisher bekannten Anthracyclin-Antibiotica, wird auch vom Beta-Rhodomycin I bevorzugt das Wachstum von grampositiven Bakterien und Mycobakterien gehemmt. Gegen Vertreter der Hefen und filamentösen Pilze läßt sich demgegenüber keine wachstumshemmende Aktivität feststellen.

Bei der Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Beta-Rhodomycin I im Vergleich zur entsprechenden Wirksamkeit der klinisch als Krebschemotherapeutica eingesetzten Anthracyclin-Antibiotica Daunorubicin und Doxorubicin ergab sich, daß die in Wasser löslichen Hydrochloride unter standardisierten Bedingungen gegen Bacillus subtilis ATCC 6633 folgende Aktivitätsunterschiede aufweisen:

<u>Anthracyclin-Antibiotica</u>	<u>Aktivität in Prozent</u>
Iremycin	100
Beta-Rhodomycin I	280
Doxorubicin	570
Daunorubicin	798

Im Vergleich zu dem cytostatisch und cancerostatisch wirksamen Violamycin A (Rhodosaminyl-Derivat des Aglykongemisches Violamycinon, DDR-Patent 100 494) zeigt Beta Rhodomycin I qualitativ vergleichbare Wirkungen bezüglich der Wechselwirkung mit der DNA in vitro und dem DNA-Stoffwechsel in der Zelle, der für die cytostatische Wirkung der Anthracyclin-Antibiotica an Mikroorganismen und Säugerzellen sowie für die cancerostatische Wirkung im Tierexperiment verantwortlich gemacht werden. Beta-Rhodomycin I unterdrückt

zudem in selektiver Weise die Vermehrung von DNA-Viren in gram-negativen Bakterien (z.B. von temperenten Lambda-Phagen in Escherichia coli C 600) bei Konzentrationen, die nicht gleichzeitig den Stoffwechsel und die Vermehrung der Wirtszellen beeinträchtigen.

Beta-Rhodomyacin I erwies sich am P 388-Modell als antileukämisch wirksam. Die maximale Wirkung beträgt 45,4 % Verlängerung der Überlebenszeit bei einer Dosis von 2 mg/kg (9 Applikationen).

Die Leukämie wurde bei diesen Untersuchungen mit 10^6 Zellen aus dem Ascites leukämischer Mäuse am 7. Tag nach der vorangehenden Transplantation übertragen. Die Haltung der P 388-Zell-Linie erfolgte auf Mäusen des Inzuchtstammes DBA/2 Jena, die experimentelle Prüfung dagegen auf AED_{2F₁}-Hybriden beiderlei Geschlechts. Beta-Rhodomyacin I wurde täglich einmal vom 1. bis 4. und vom 7. bis 11. Tag nach der Tumorübertragung intraperitoneal appliziert. Lösungen von Beta-Rhodomyacin I-Hydrochlorid wurden je einmal für die ersten 4 und die folgenden 5 Injektionen hergestellt und über die entsprechenden Zeiträume bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Detaillierte Angaben zu den Testbedingungen sind von Gutsche et al. beschrieben (Arch. f. Geschwulstforsch., 51, 5 (1981), 394-404; Folia haematologica, 108, 5 (1981), 647-651; Pharmazie (1982), 00, 000-000 (im Druck).

Beta-Rhodomyacin I kann als ein bisher nicht verfügbares Anthracyclin-Antibioticum angesehen werden, dessen biologische Wirkung eine potentielle Anwendung als Chemotherapeuticum gegen Tumor-, Virus- und durch Bakterien hervorgerufene Erkrankungen bei Mensch und Nutztier ermöglichen.

Ausführungsbeispiele

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

Glucose	1,5 %
Sojamehl	1,5 %
Na-Chlorid	0,5 %

Ca-Karbonat	0,1 %
primäres	
K-Phosphat	0,03 %
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 Min. bei 110 °C. Acidität nach Sterilisation liegt bei pH 6,3. Jede Steilbrustflasche wird mit einer Sporen- oder Mycelsuspension des Beta-Rhodomycin I-Bildners 43 678 beimpft, welche mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung von einer im Reagenzglas auf folgendem Anzucht-Nährboden gezüchteten, 10 bis 14 Tage alten Kultur des Beta-Rhodomycin I-Bildners hergestellt wird:

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

Sterilisation: 35 Min. bei 120 °C, natursauer.

Die beimpften Vorzuchtkulturen 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:

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

Sterilisation: 35 Min. 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.

2. Man verfährt wie im Beispiel 1 mit dem Unterschied, daß das Produktionsmedium folgende Zusammensetzung hat:

Glukose	3,0 %
Sojamehl	3,0 %
Na-Chlorid	0,3 %
Ca-Karbonat	0,3 %

in Leitungswasser

Sterilisation: 35 Min. bei 115 °C. Die Acidität liegt nach dem Sterilisieren bei pH 6,2.

3. Mit einer Kultur des Beta-Rhodomycin I-Bildners von einem festen Nährboden wie in Beispiel 1 beschrieben, beimpft man 80 ml des in Beispiel 1 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 im Beispiel 1 beschriebenen Produktions-Mediums dienen. Letzteres ist in einem 32 l-Glasfermenter enthalten. Während der 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, silikonhaltiger Schaumschutzmittel kontrolliert werden. 210 l auf diese Weise gewonnene Kulturlösung werden mit Salzsäure auf pH 4,0 eingestellt und nach Separieren des Mycels werden 19,8 kg Mycel und 155 l Kulturfiltrat erhalten. Danach werden die 155 l Kulturfiltrat mit Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt und mit 100 l Butanol ausgerührt. Der so erhaltene Butanolextrakt wird anschließend bis zum Farbumschlag mit Salzsäure angesäuert und im Vakuum auf 1/25 des Ausgangsvolumens eingeengt. Aus dem Endkonzentrat läßt sich unter Zufügen des 3-fachen Volumens an Petroläther das Rohprodukt A 43 678 ausfällen, mit Petroläther waschen und unter vermindertem Druck im Exsikkator über konz. Schwefelsäure trocknen.

Von 19,8 kg Mycel werden mit 70 l Methanol ein erster und zweiter Extrakt hergestellt, wobei vor der 2. Extraktion dem Methanol 300 ml Salzsäure (1:1 mit Wasser

verdünnt) zugesetzt werden. Die erhaltenen Methanolextrakte werden filtriert, mit Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt, vereinigt und im Vakuum eingeengt. Das wässrige Methanolextrakt-Konzentrat des Mycels wird bei pH 7 bis pH 9 mit Butanol erschöpfend extrahiert, wobei für 5 l des Mycelextrakt-Konzentrates 5 l Wasser und 5 l Butanol eingesetzt werden. Nach Abtrennen der die Pigmente enthaltenden Butanol-Phase wird letztere mit Salzsäure wieder angesäuert, nachfolgend wird konzentriert, mit Petroläther ausgefällt, gewaschen und im Vakuum über konz. Schwefelsäure getrocknet. Die Ausbeute an Rohprodukt A 43 678 beträgt 55 g.

4. 10 g Rohprodukt A 43 678 werden in 50 ml Methanol aufgenommen, mit 1 l Wasser versetzt, mit NaHCO_3 auf pH 7,9 eingestellt und erschöpfend (3 mal) mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wird abgetrennt, mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und unter vermindertem Druck bei 20°C zur Trockne eingeengt. Man erhält 3,1 g Anthracyclin-Rohprodukt. Zur Abtrennung des Beta-Rhodomyacin I wird das Rohprodukt in Chloroform aufgenommen und 2 mal an Kieselgel (NaHCO_3 -gepuffert - 0,05 bis 0,2 mm) mit CHCl_3 - CHCl_3 /Aceton=80:20 - CHCl_3 :Aceton:Methanol=80:20:6 und anschließend an Kieselgel (0,05 bis 0,2) mit CHCl_3 :Methanol: H_2O =70:20:2 chromatografiert und aus Chloroform/Petroläther in reiner Form isoliert. Die Ausbeute beträgt 130 mg Beta-Rhodomyacin I. Das entspricht einer Ausbeute von 3,5 g reines Beta-Rhodomyacin I pro m^3 Fermentationsflüssigkeit.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Herstellung eines Anthracyclin-Antibioticums sowie seines Aglykons, dadurch gekennzeichnet, daß ein neuer Mikroorganismus, Streptomyces violaceus subsp. iremyceticus, Stamm ZIMET 43 678, unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur zwischen 25 und 37 °C während eines Zeitraumes von 2 bis 6 Tagen kultiviert wird und das gebildete Anthracyclin-Antibioticum Beta-Rhodomycin I sowohl aus dem Mycel als auch aus dem Kulturfiltrat bei einer Acidität zwischen pH 3 und pH 9 mittels üblicher Lösungsmittel extrahiert, nachfolgend mit üblichen Methoden konzentriert, ausgefällt und chromatografisch gereinigt oder mit anorganischen bzw. organischen Säuren in seine Salze übergeführt oder durch Säurehydrolyse in sein Aglykon umgewandelt wird.

Hierzu 1 Seite Formeln.

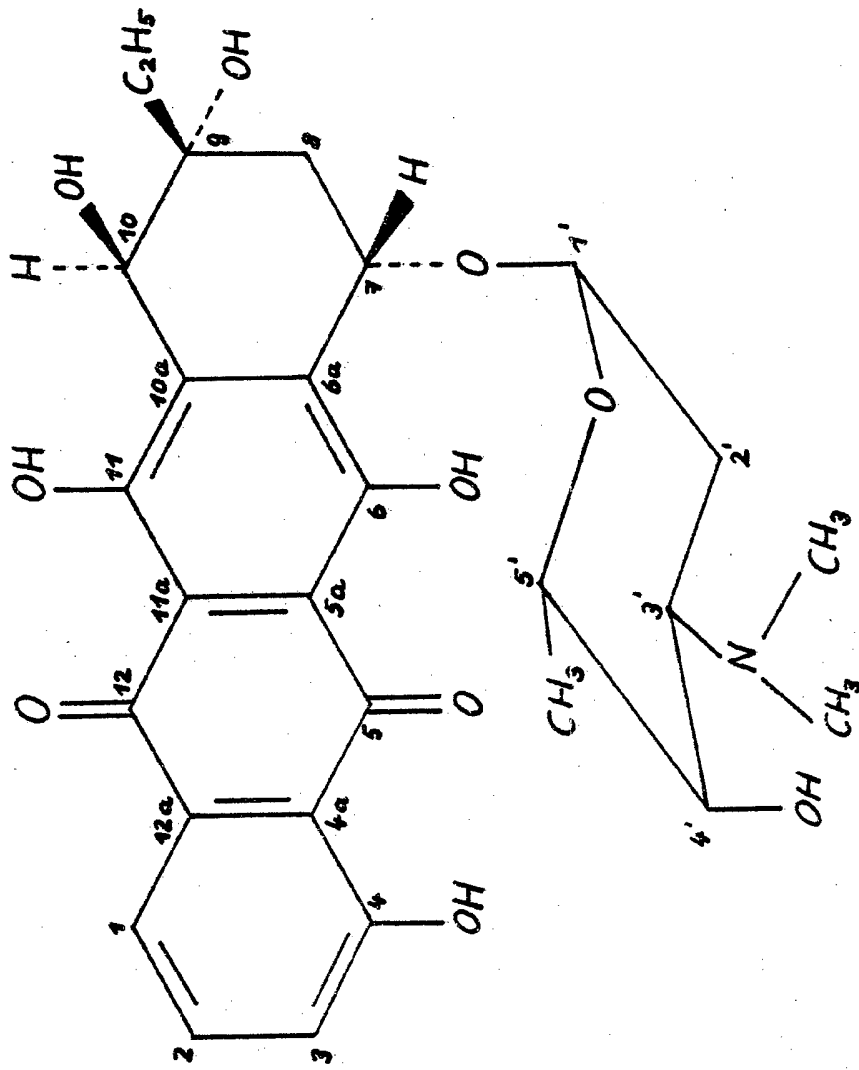


Abb. 1 Beta - Rhodomyacin I