



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 428 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 17/16
C 12 P 17/02
C 12 R 1:465

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 P / 332 078 0 (22) 25.08.89 (44) 20.02.92

- (71) siehe (73)
(72) Gräfe, Udo, Prof. Dr. sc. nat.; Stengel, Cornelia, Dipl.-Biol.; Schlegel, Rolf, Dr. rer. nat.; Wiesner, Joachim, Dr. rer. nat.; Ihn, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Fleck, Werner, Dr. habil. rer. nat., DE
(73) Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, O - 6900 Jena, DE
(74) ZIMET, Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena, DE

(54) Verfahren zur Herstellung von 6-Desmethyl-alborixin

(55) Polyether-Antibiotikum; 6-Desmethyl-alborixin; submerse Kultivierung eines Mikroorganismus; Produktionsstamm Streptomyces umbrinus AM4805; Bildung als Einzelkomponente; Gewinnung in reiner Form; antibakterielle und kokzidiostatische Wirksamkeit
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikums vom Typ der Polyether-Antibiotika mit der chemischen Bezeichnung 6-Desmethyl-alborixin. Das Antibiotikum wird überwiegend als Einzelkomponente durch einen neuen Mikroorganismenstamm als Produktionsorganismus, Streptomyces umbrinus AM4805 (IMET 43898), im Verlauf der submersen Kultivierung gebildet. 6-Desmethyl-alborixin wird aus dem Myzel extrahiert und durch chromatographische Verfahren in reiner Form gewonnen. 6-Desmethyl-alborixin ist ein Antibiotikum mit antibakterieller und kokzidiostatischer Wirksamkeit.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von 6-Desmethyl-alborixin mittels aerober Submersfermentation in flüssigen Nährmedien mit Kohlenstoff- sowie Stickstoffquellen und Mineralsalzen, gekennzeichnet dadurch, daß man
 - den Mikroorganismus *Streptomyces umbrinus* AM4805 für die Dauer von 48 Stunden bis 192 Stunden kultiviert und
 - das Zielprodukt aus dem Myzel isoliert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß man
 - Stamm *Str. umbrinus* AM4805 während 144 Stunden kultiviert und
 - das Zielprodukt aus dem Myzel mit organischen Lösungsmitteln extrahiert sowie durch anschließende Chromatographie an Kieselgel und organophilem Dextrangel rein gewinnt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß man zur Extraktion Methanol bzw. Aceton einsetzt.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Antibiotikums der Polyether-Gruppe mit der chemischen Bezeichnung 6-Desmethyl-alborixin. Vertreter der Strukturklasse der Polyether-Antibiotika sind für die Prävention und Therapie von tierischen Kokzidien-Erkrankungen sowie für die Anzucht von Nutztieren als Ergotropikum (Pansenfermoregulator) von potentiell Nutzen. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt somit in der mikrobiologisch-pharmazeutischen Forschung und Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Polyether-Antibiotika werden vorwiegend von Streptomyceten gebildet und besitzen ionophore Eigenschaften, indem sie den passiven Transport von Ionen durch biologische Membranen ermöglichen. Die ionophoren und membranotropen Eigenschaften sind die Ursache für antibakterielle Wirkungen gegen grampositive Keime, für die kokzidiostatische Aktivität und für die pansenfermoregulatorische Beeinflussung polygastrischer Nutztiere. Einige Vertreter der Gruppe der Polyether-Antibiotika haben aufgrund dieser Eigenschaften breite Anwendung in der Tierhaltung sowohl als Kokzidiostatikum wie als Ergotropikum gefunden (J. W. Westley, Polyether Antibiotics, Vol. 1, Biology, Marcel Dekker, 1982). Aufgrund von Nebenwirkungen bei den bisher eingesetzten Polyether-Antibiotika (Toxizität), der Konkurrenz durch ökonomisch günstiger herstellbare Präparate (größere Wirkung bei niedrigeren Konzentrationen) und bestehender Schutzrechte wird die Suche nach neuen Polyether-Ionophoren sowie die Ermittlung ihrer Anwendungseigenschaften nach wie vor fortgesetzt.

Das Polyether-Antibiotikum 6-Desmethyl-alborixin wurde unter der Bezeichnung X-206 bereits 1951 als Produkt eines nichtidentifizierten Stammes, *Streptomyces* spec. X-206, isoliert (Berger et al., J. Amer. Chem. Soc. 73, 5295 [1951]). Die Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse erfolgte 1975 (Blount u. Westley, Chem. Commun. 333, 1975). Ein Verfahren zur fermentativen Herstellung dieses Antibiotikums im technischen Maßstab ist bisher noch nicht angegeben worden. Weitere Bildner von 6-Desmethyl-alborixin sind bisher nicht bekannt; auch die kokzidiostatische Wirksamkeit (in vivo) dieser Substanz ist bisher noch nicht ausgewiesen worden (Westley, J. W., Polyether Antibiotics, a. a. O., 1982).

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, das Polyether-Antibiotikum 6-Desmethyl-alborixin in verbesserter Weise herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein mikrobiologisches Verfahren zu beschreiben, mit dem das Polyether-Antibiotikum 6-Desmethyl-alborixin im technischen Maßstab aus leicht zugänglichen Einsatzstoffen in guten Ausbeuten hergestellt werden kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen in einem flüssigen Nährmedium mit Kohlenstoff- sowie Stickstoffquellen und Mineralsalzen eine Population des Mikroorganismus *Streptomyces umbrinus* AM4805 gezüchtet wird. Eine biologisch reine Probe von Stamm *Streptomyces umbrinus* AM4805 ist in der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen der DDR, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Beutenbergstraße 11, Jena, DDR-6900 unter dem Registrierzeichen IMET 43898 deponiert worden. Stamm *Streptomyces umbrinus* AM 4805 ist ein literaturbekannter Mikroorganismus; seine taxonomische Bestimmung erfolgte bereits vor geraumer Zeit (T. G. Pridham et al., Applied Microbiology, 6, 52-79, 1958). Bisher ist nicht bekannt geworden, daß in mikrobiologischen Verfahren irgendwelche Leistungen dieses Stammes genutzt worden wären.

Die Fermentation des Stammes AM 4805 erfolgt in den Stufen Vor- und Hauptkultur. Für die Vorkultur werden in 5%iger Glucose-Gelatine-Lösung lyophil getrocknete Myzel fragmente dieses Stammes in Glucose-Sojamehl-Nährmedien mit Mineralsalz-Zusätzen, vorzugsweise in solchen mit Phosphationen-Zusatz, eingepflegt und pro Vorzuchtstufe jeweils 48 Stunden bei Temperaturen im Bereich von 25°C bis 37°C sowie bei Aciditäten zwischen pH 6,0 und pH 6,5 unter Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur wird in gerührten Glasfermentoren oder in belüftbaren V2A-Stahltanks in Glucose-Fleischextrakt-Mineralsalz-Nährmedien mit Hafermehl-Anteil, die jedoch frei von Phosphationen sind, während einer Dauer von 48 Stunden bis 192 Stunden durchgeführt. Hierbei werden

- die Temperatur bei Werten von 25°C bis 37°C und
- die Acidität im Bereich von pH 6,0 bis pH 8,5

belassen.

Die Gewinnung von 6-Desmethyl-alborixin erfolgt durch Separation der Biomasse am Ende der Fermentation, durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise mit Methanol oder Aceton, gefolgt von einer Konzentration des Extraktes, durch Reextraktion mit wasserunlöslichen organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise mit Chloroform, und durch abschließende chromatographische Auftrennung der Bestandteile des eingeeengten Extraktes unter Verwendung an sich bekannter Adsorbentien (Kieselgel und organophile Dextranale). Durch schrittweise chromatographische Abtrennung von antibakteriell inaktiven Verunreinigungen (ermittelt unter Verwendung des Testkeims *Bacillus subtilis* ATCC 6633) wird letztlich chromatographisch reines 6-Desmethyl-alborixin gewonnen, dessen chemische Struktur in Abb. 1 dargestellt ist. Nach dem voranstehend beschriebenen Verfahren mit biologischer Prozeß- und extraktiv-chromatographischer Aufarbeitungsstufe wird das reine Zielprodukt in Ausbeuten bis zu 25 mg/l Fermentationslösung gewonnen.

Die chemische Identität des durch *Streptomyces umbrinus* AM 4805 gebildeten 6-Desmethyl-alborixins mit der in Abb. 1 angegebenen Struktur sowie des seit Berger et al. (1951) bekannten Antibiotikums X-206 konnte durch Hochfeld-NMR-Untersuchungen (400 MHz ^1H COSY NMR; 100 MHz ^{13}C 2D NMR; Varian XLAA 400) bestätigt werden. Das in Abb. 2 gezeigte 100 MHz ^{13}C NMR-Spektrum entspricht in allen Details den für Antibiotikum X-206 publizierten Angaben (Seto u. Otake, Polyether Antibiotics, Vol. 2, Chemistry, S.335, Marcel Dekker, 1983). Abb. 3 zeigt das 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von 6-Desmethyl-alborixin aus *Streptomyces umbrinus* AM 4805.

Verfahrensgemäß erhaltenes Rein-6-Desmethyl-alborixin zeigt die in Tabelle 1 ausgewiesene antitumorale Wirkung gegen Stamm Elmerla tenella WCAM (bei Verwendung von intraallantoisch infizierten Hühnerembryonen).

Die Vorteile der Erfindung werden in erster Linie darin gesehen, daß

- ein für die 6-Desmethyl-alborixin-Herstellung neuer Mikroorganismus erschlossen wird,
- durch die Verfahrensführung in der biologischen Prozeßstufe die Gewinnung des Zielprodukts auch bei Einsatz eines insgesamt unaufwendig bereitstellbaren Nährmediums in guten Ausbeuten gelingt und
- im vorgeschlagenen Verfahren das Zielprodukt als Einzelkomponente erhalten wird, d.h. eine Mit-Synthese von Metaboliten anderer antibiotisch wirksamer Strukturklassen ausgeschaltet werden konnte.

Ausführungsbeispiel

Schrägar-Eprouvetten mit in 5%iger Glucose-Gelatine-Lösung lyophil getrockneten Myzel fragmenten des Stammes *Streptomyces umbrinus* AM 4805 dienen zur Beimpfung eines Vorzuchtmediums folgender Zusammensetzung (g/l) in 500-ml-Steilbrustflaschen (80 ml Inhalt, 25°C, Rotationsschüttler, 48 Stunden Kultivierungszeit): Glucose 15; Sojamehl 15; NaCl 5; CaCO_3 1; KH_2PO_4 0,3; pH 6,3. Die zweite Vorzucht wird auf dem gleichen Vorzuchtmedium in 5-l-Flaschen mit 400 ml Inhalt durchgeführt (48 Stunden, 25°C, Rotationsschüttler 240 UpM). Für die Maßstabvergrößerung auf 20 l und die Hauptkultur wird ein Medium folgender Zusammensetzung verwendet (g/l): Glucose 20; Fleischextrakt 3; Hafermehl 20; NaCl 3; CaCO_3 3; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,4; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,6; pH 7,0; Sterilisation: 30 Minuten bei 120°C; 29°C. Die Hauptkultur wird in 500-l-V2A-Tankfermentoren während 144 Stunden durchgeführt bei 500 l/Luft eintrag pro Minute.

Anschließend wird das Myzel abgetrennt und mit dem dreifachen Anteil des Feuchtgewichtes des Myzels mit Methanol 24 Stunden lang unter Rühren bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Abtrennung des extrahierten Myzels wird der methanolische Extrakt im Vakuumrotationsverdampfer konzentriert. Der wäßrige Rückstand wird mit 10 l Chloroform reextrahiert und der getrocknete Extrakt eingeeengt. Das eingeeengte Produkt wird durch Chromatographie an Kieselgel 60 portionsweise (10 g Rückstand pro 200 g) unter Verwendung von CHCl_3 und $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ (95:5, v/v) als Laufmittel vorgereinigt. Die durch die antibiotische Wirksamkeit gegenüber dem Testkeim *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ausgezeichneten Fraktionen werden gesammelt und der Säulenchromatographie an organophilen Dextranalen (Methanol als Laufmittel) unterworfen. Die Feinreinigung der bioaktiven Fraktionen erfolgt durch Kieselgelchromatographie (Säulen, Dünnschichtplatten) unter Verwendung von $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5, v/v) als Laufmittel. Nach der Elution der bioaktiven Zonen wird reines 6-Desmethyl-alborixin (Rf 0,7; DC-Folie Kieselgel; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$; 9:1, v/v) erhalten; Ausbeute 10 g aus 400 l Fermentationslösung.

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1: Chemische Struktur von 6-Desmethyl-alborixin

Abb. 2: 100 MHz ^{13}C NMR-Spektrum von 6-Desmethyl-alborixin (chemische Verschiebung in ppm; TMS als interner Standard)

Abb. 3: 400 MHz ^1H NMR-Spektrum von 6-Desmethyl-alborixin (chemische Verschiebung in ppm; TMS als interner Standard)

Tabelle 1

Antikokzidiale Wirksamkeit von 6-Desmethyl-alborixin im In-vitro-Modellversuch (intraallantoisch mit *Elmeria tenella* WCAM infizierten Hühnerembryonen; LD₅₀ ca. 14 µg)

Konzentration (µg/Embryo)	Gruppenstärke (n)	Letalität im Experiment	Letalität Kontrollgruppe	Test- ergebnis
10	24	0%	52,2%	+++
3,3	24	0%	52,2%	+++
1,1	24	0%	52,2%	+++
0,33	22	0%	100%	+++
0,11	22	10,5%	100%	+++
0,04	22	90,9%	100%	n. s.

+++ = p 0,001 (Vierfeldertest nach Fisher).

n. s. = nicht signifikant.

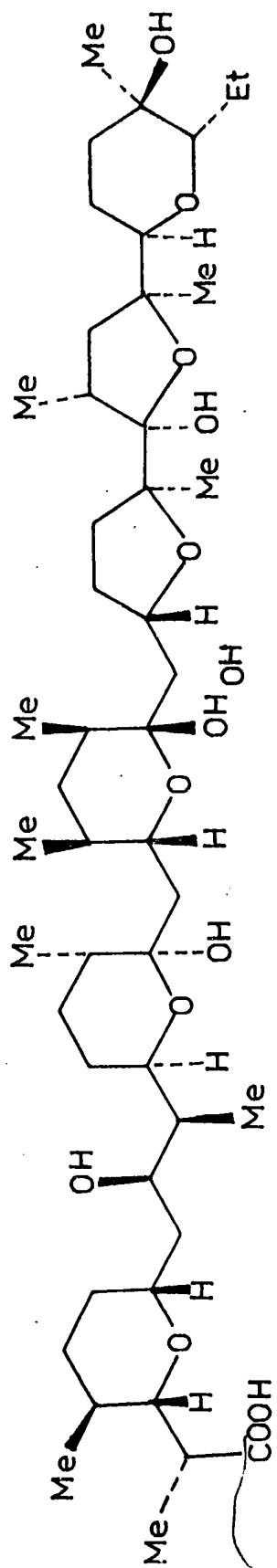


Abb. 1

-5-

298429

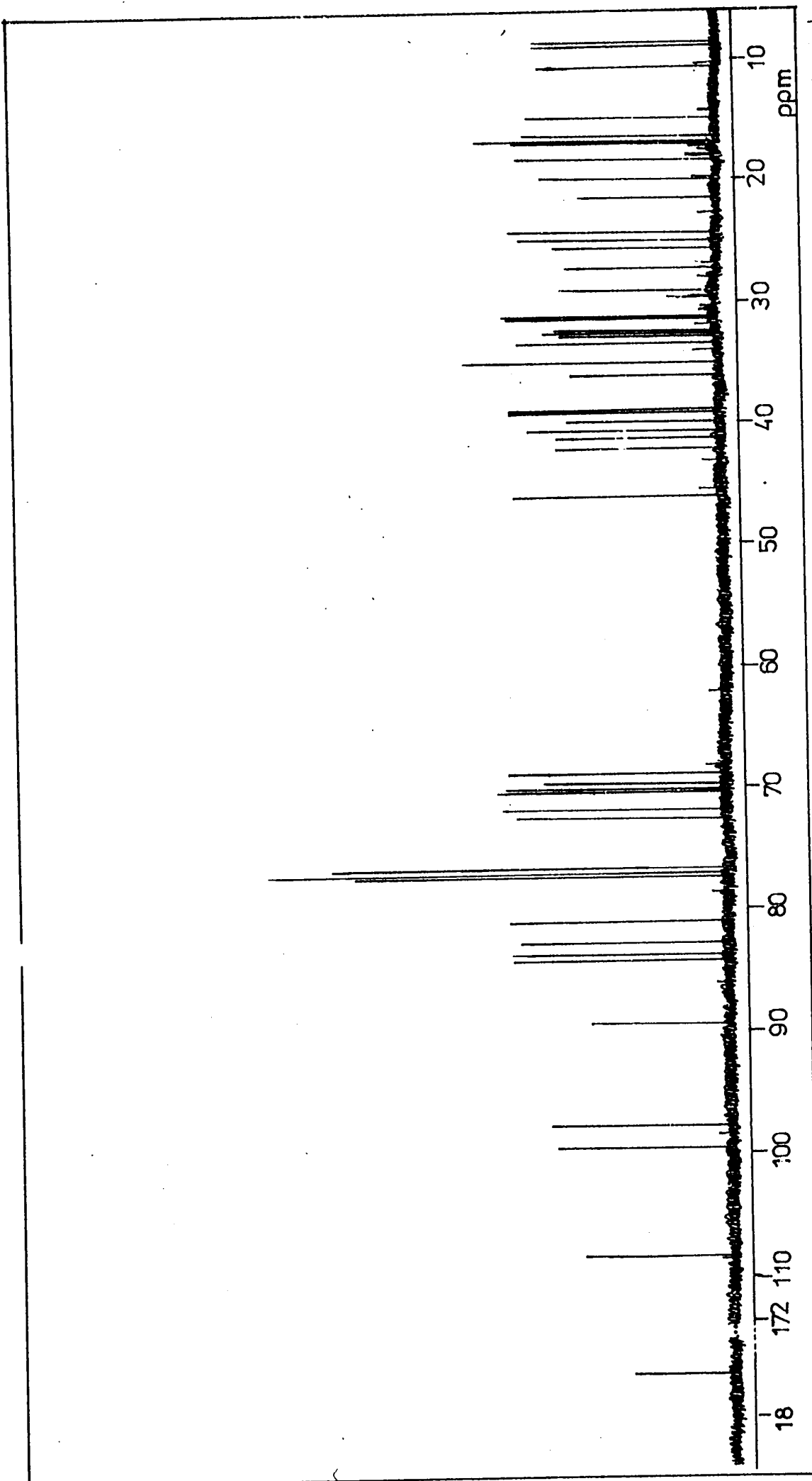


Abb. 2

298428

-6-

Abb.3

