



Patent
aufrechterhalten nach
§ 12 Abs. 3 ErstrG

(51) Int. Cl.⁵: C 12 P 15/00
C 12 P 7/66
||(C 12 P 15/00; C 12 R 1:465)

DEUTSCHES PATENTAMT

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Aufrechterhaltung kann Einspruch eingelegt werden

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(44) Veröff.-tag der DD-Patentschrift:	(45) Veröff.-tag der Aufrechterhaltung:
DD C 12 P / 261 311 7	28.03.84	07.08.85	25.08.94

(30) Unionspriorität:

(72) Erfinder: Eckardt, Klaus, Dipl.-Chem. Dr. rer. nat., 07743 Jena, DE; Schumann, Gisbert, Dipl.-Biol., 07743 Jena, DE; Tresselt, Dieter, Dipl.-Phys. Dr. rer. nat., 07743 Jena, DE; Ihn, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. rer. nat., 07749 Jena, DE; Wagner, Christina, Dipl.-Biol., 07745 Jena, DE; Fleck, Werner, Dipl.-Biol. Dr. habil. rer. nat., 07743 Jena, DE

(73) Patentinhaber: Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e. V., Beutenbergstr. 11, 07745 Jena, DE

(54) Verfahren zur Herstellung von Aklanonsäure

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:

EP 62 327 A 1; Tobe, M. et al., J. Antibiot., 1982, 34: 1641–45
Yoshimoto, A. et al., J. Antibiot., 1980, 33: 1150
Oki, T. et al., J. Antibiot., 1980, 33: 1331

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Aklanonsäure, **gekennzeichnet dadurch**, daß Streptomyces spec. ZIMET 43717 unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die eine Kohlenstoff-, eine Stickstoff-Quelle sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur von 25 bis 37°C, während eines Zeitraumes von 2 bis 6 Tagen, kultiviert und die gebildete Aklanonsäure aus dem Mycel mittels üblicher Lösungsmittel extrahiert, nachfolgend mit üblichen Methoden konzentriert, ausgefällt und chromatographisch gereinigt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1., **gekennzeichnet dadurch**, daß die Fermentation bei einer Temperatur von 28°C und über einen Zeitraum von 4 Tagen durchgeführt wird.

Hierzu 1 Seite Formeln

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Aklanonsäure auf mikrobiologischem Wege. Aklanonsäure ist eine geeignete Vorstufe zur halbsynthetischen Herstellung verschiedener neuer antibiotisch wirksamer Substanzen, die bei der Chemotherapie von Tumor-, Virus- und von Bakterien hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Nutztier sowie als Immunsuppressiva und Ergotropica von potentielltem Nutzen sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Aklanonsäure ist ein neues Produkt. Ein Verfahren zur Herstellung ist bisher nicht bekannt. Drei strukturell ähnliche Anthrachinon-Derivate wurden in Kulturbrühen von zwei Mutanten des Aclacinomycin-Bildners Streptomyces galilaeus MA 144-M1 gefunden (Tobe, M. et al., 1982. J. Antibiot., **34**, 1641–1645). Als Ausgangssubstanzen für Mutasynthesen bzw. Partialsynthesen von Anthracyclin-Antibiotika wurden bisher Anthracyclinone (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., **33**, 1158–1166; Yoshimoto, A. et al., 1981. J. Antibiot., **34**, 1492–1494; Eur. Pat. appl. EP 62, 327, 13 Oct 1982) bzw. Anthracycline (Arcamone, F.: Doxorubicin. Academic Press, New York 1981) eingesetzt.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat die ökonomisch günstige Herstellung von Aklanonsäure zum Ziel.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren zu beschreiben, mit dem Aklanonsäure als Ausgangsprodukt für Mutasynthese bzw. Partialsynthese von Anthracyclin-Antibiotika auf mikrobiologischem Wege hergestellt werden kann. Überraschend wurde gefunden, daß der aus einer Erdbprobe von der Schwellenburg bei Erfurt isolierte Mikroorganismus Streptomyces spec. S.706 es gestattet, Aklanonsäure aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen in guten Ausbeuten herzustellen.

Unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen wird in einem flüssigen Nährmedium mit entsprechenden Kohlenstoff-, Stickstoffquellen und Mineralsalzen der Mikroorganismus oder seine Varianten gezüchtet. Der Mikroorganismus, der in diesem Verfahren Anwendung findet, ist unter der Registriernummer ZIMET 43717 in der ZIMET Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, 6900 Jena, Beutenbergstraße 11, hinterlegt worden. Der Mikroorganismus besitzt die für die Gattung Streptomyces charakteristischen Eigenschaften, ist jedoch nicht fähig, Luftmycel und Sporen zu differenzieren, so daß eine Artzuordnung unmöglich ist. Für den Bildner der Aklanonsäure wird daher die Bezeichnung Streptomyces spec. ZIMET 43717 gewählt. Die Kultivierung des Stammes ZIMET 43717 sowie seiner Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. An Glucose/Gelatine (5%ig) lyophilisierte Mycelfragmente werden auf geeignete Agarnährmedien geimpft und das entstehende 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 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 organischen Salzen. Als Kohlenstoffquelle können Stärke, Glukose, Glycerin, Dextrin, Mannit, Saccharose, Sojaöl und Sojamehl verwendet werden. Als Stickstoffquelle kommen außer den o.ä. stickstoffhaltigen Substraten auch Trockenhefe, Fleischpepton und Casein in Frage. Gute Ergebnisse können bei Zugabe 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, Natrium-Phosphat bzw. Kalium-Phosphat als vorteilhaft erwiesen. Die Isolierung der Aklanonsäure wird in der Weise durchgeführt, daß die Substanz aus dem tiefroten Mycel mit organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Aceton, extrahiert, nach Konzentrieren mit Wasser versetzt und bis zum Farbumschlag nach gelb angesäuert wird. Nunmehr wird die Substanz durch Zugabe von organischen mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln erneut extrahiert und aus den Extraktkonzentraten durch Zugabe von Petroläther ausgefällt. Durch Abfiltrieren und Waschen mit Petroläther wird Aklanonsäure als gelbbraunes Pulver erhalten, das durch Säulenchromatografie weiter gereinigt werden kann. Die auf diese Weise isolierte reine Aklanonsäure ist eine in gelb-orangefarbenen Nadeln kristallisierende Substanz. Sie löst sich mäßig gut in Chloroform, wenig in Aceton, Methanol und Wasser. Aklanonsäure löst sich leicht in Natriumbicarbonatlösung mit brauner Farbe sowie in NaOH und in konz. Schwefelsäure mit roter Farbe. Die rote Farbe in verdünnter NaOH schlägt nach Ansäuern nach gelb um. Die Substanz läßt sich aus C₂H₅OH leicht umkristallisieren und schmilzt danach bei 203–204°C (Zers.). Aklanonsäure hat die Summenformel C₂₁H₁₆O₈ (MG = 396). Maxima UV/Vis (CHCl₃): 258, (282), 438nm. IR (KBr) im CO-Bereich: 1622, 1670, 1700cm⁻¹. MS: m/z M.⁺ –; 352,0934 C₂₀H₁₆O₆ (M⁺ – CO₂); sowie 337 (C₉H₁₃O₆); 334 (C₂₀H₁₄O₅); 323 (C₁₈H₁₁O₆); 295 (C₁₇H₁₁O₅); 281 (C₁₆H₉O₅); 277 (C₁₇H₉O₄); 254 (C₁₅H₁₀O₄). NMR: Tabelle 1. Die Sturkturformel ist in Abb.1 gezeigt.

Zur näheren Charakterisierung der Aklanonsäure dienen folgende Derivate:

Aklanonsäuremonomethylester. Durch Einwirkung von etherischer Lösung von Diazomethan auf Aklanonsäure in CHCl₃/CH₃OH, 2Min. bei 0°C: gelbe Kristalle (C₂H₅OH). Schmelzpunkt: 143–144°C. Summenformel: C₂₂H₁₈O₈. Analyse: ber.: C 64,39, H 4,39; gef.: C 63,91, H 4,40. IR (KBr): 1625, 1675, 1748cm⁻¹. MS: m/z M.⁺ 410, 1010 (C₂₂H₁₈O₈); 392 (C₂₂H₁₆O₇); 381

$C_{20}H_{13}O_8$); 379 ($C_{21}H_{15}O_7$); 354 ($C_{19}H_{14}O_7$); 353 ($C_{19}H_{13}O_7$); 349 ($C_{19}H_9O_7$); 339 ($C_{18}H_{11}O_7$); 337 ($C_{19}H_{13}O_6$); 323 ($C_{18}H_{11}O_6$); 322 ($C_{18}H_{10}O_6$); 307 ($C_{17}H_7O_6$); 295 ($C_{16}H_7O_6$); 294 ($C_{17}H_{10}O_5$); 281 ($C_{16}H_9O_5$); 251 ($C_{15}H_7O_4$). NMR: Tabelle 1

Ausführungsbeispiel

Durch das nachfolgende Ausführungsbeispiel soll die Erfindung erläutert, jedoch nicht begrenzt 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 %
in Leitungswasser	

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

Jede Steilbrustflasche wurde mit einer Mycelsuspension beimpft, welche mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung von einer im Reagenzglas auf folgendem Anzucht-Nährboden gezüchteten 10 bis 14 Tage alten Kultur des Stammes ZIMET 43717 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 Kaliumphosphat	0,050 %
Agar-Agar	2,000 %
in Aqua dest.	

Sterilisierung: 40 min bei 116°C. Nach der Sterilisierung liegt die Acidität zwischen pH 6,5 und pH 7,0. Die beimpften Vorzucht-Kulturen werden 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 Produktionsmediums enthalten:

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

Sterilisierung: 35 min bei 110°C. Die Acidität beträgt nach der Sterilisation pH 6,3.

Die Temperatur während der Fermentation liegt bei 28°C und die Schüttelfrequenz bei 180 U/min. Nach 72–96stündiger Fermentation wird die höchste Ausbeute an Aklanonsäure erreicht.

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

Kartoffelstärke	1,0000 %
Glukose	1,0000 %
Sojamehl	1,5000 %
prim. Kaliumphosphat	0,1000 %
Natriumchlorid	0,3000 %
Magnesiumsulfat	0,1000 %
Kupfersulfat	0,0070 %
Eisensulfat	0,0001 %
Magnesiumchlorid	0,0008 %
Zinksulfat	0,0002 %

Sterilisierung: 30 min bei 120°C. Die Acidität liegt nach der Sterilisierung bei pH 7,0.

C) Man verfährt wie bei B) mit dem Unterschied, daß das Vorzucht- und Produktionsmedium folgende Zusammensetzung aufweist:

Vorzucht-Medium:	Dextrin	1,000 %
	Saccharose	0,300 %
	Harnstoff	0,010 %
	Natriumchlorid	0,050 %
	primäres Kaliumphosphat	0,050 %
	Hefeextrakt	0,100 %
	Pepton (bakt.)	0,500 %
	Eisensulfat	0,001 %
	in Aqua dest.	

Sterilisierung: 40 min bei 120°C. Acidität nach dem Sterilisieren pH 6,5 bis pH 7,0.

Produktions-Medium:	Glukose	4,000 %
	Trockenhefe	1,500 %
	Natriumchlorid	0,200 %
	sekundäres Kaliumphosphat	0,100 %
	Calciumkarbonat	0,100 %
	Magnesiumsulfat	0,010 %
	Eisensulfat	0,001 %
	Zinksulfat	0,001 %

Kupfersulfat 0,001 %
in Leitungswasser

Sterilisierung: 30 min bei 120°C (Glukose separat 20 min bei 110°C). Acidität nach dem Sterilisieren: pH 7,0.

- D) Das Verfahren unterscheidet sich von demjenigen des Verfahrensteiles A) dadurch, daß die zu beimpfende Kultur aus folgendem halbfesten Nährboden entwickelt wird:

Hafermehl 2,0 %
Agar-Agar 2,0 %
in Leitungswasser

Die Sterilisierung wird in üblicher Weise durchgeführt und die Acidität liegt bei pH 7,0. Anschließend beimpft man das im Verfahrensteil A) beschriebene Vorzucht-Medium, und mit dem so erhaltenen Impfmateriel 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 %
Calciumcarbonat 0,3 %
in Leitungswasser

Sterilisierung: 40 min bei 110°C. Nach dem Sterilisieren liegt die Acidität bei pH 7,0.

- E) Mit einer Kultur des Stammes ZIMET 43717 von einem halbfesten Nährboden, wie unter D) beschrieben, beimpft man 400 ml des im Verfahrensteil A) angeführten flüssigen Vorzucht-Mediums, welches in einem 2l-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 zu Beimpfung von 20 l des im Verfahrensteil A) beschriebenen Produktions-Mediums, das in einem 32l-Glasfermenter enthalten ist. Während der Fermentation, die mit einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/min und mit einer Luftzufuhr von 15 l/min ausgeführt werden kann, wird die Schaumbildung durch Zusatz kleiner Mengen von Sonnenblumenöl oder anderer silikonhaltiger Schaumschutzmittel kontrolliert.
- F) Als Anzucht-Agar wird der unter E) beschriebene eingesetzt, die Vorzucht in dem im Teil A) aufgeführten Medium zunächst für 24 Stunden in einer 500 ml-Steilbrustflasche mit 80 ml Inhalt und daran anschließend für weitere 24 Stunden im gleichen Medium in einem 2l-Glaskolben mit 400 ml Inhalt durchgeführt wird, ehe ein 400l-V2A-Tank beimpft werden kann, der das im Teil A) beschriebene Produktionsmedium enthält. Die Rührgeschwindigkeit wurde auf 280 U/min und die Luftzufuhr auf 400 l/min eingestellt.
- G) 5,6 l Kulturflüssigkeit, die man durch Vereinigen einer Reihe von Fermentationsansätzen nach Teil A) erhielt, wurden ohne Veränderung des pH-Wertes zentrifugiert und das tiefrote Mycel 3× mit je 200 ml Aceton und anschließend mit 200 ml Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und durch Zugabe von verd. HCl bis zum Farbumschlag nach braun angesäuert. Durch Zugabe von 500 ml Wasser trennte sich die Chloroformphase ab. Es wurden weitere 200 ml CHCl_3 zugefügt und umgeschüttelt, wobei die gelbe Färbung weitgehend in die Chloroformphase überging. Ein Teil der Substanz fiel dabei als gelber Niederschlag aus. Die Chloroformphase wurde abgetrennt und beide Phasen zur Gewinnung des Niederschlages abgesaugt. Der Niederschlag wurde in Chloroform/Aceton (1:1) gelöst und durch Zugabe von Wasser die Chloroformphase abgeschieden. Beide Chloroformphasen wurden vereinigt, mit H_2O gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wurde der Chloroformextrakt im Vakuum auf 30 ml eingeengt, wobei Aklanonsäure in gelborangen Nadeln ausfiel, die abfiltriert und mit Petrolether gewaschen wurden. Aus der Mutterlauge kann durch Fällung mit Petrolether eine weitere Menge an Aklanonsäure gewonnen werden. Ausbeute: 811 mg.
- Zur Reinigung kann die Substanz in Chloroform-Methanol (100:10) gelöst und auf eine Säule mit KH_2PO_4 -gepuffertem Kieselgel aufgegeben werden. Durch Elution mit dem gleichen Lösungsmittel wandert die Aklanonsäure als gelbe Zone, die aufgefangan und konzentriert wird. Dabei fällt die Substanz in Form von orangefarbenen Nadeln aus.

Tabelle ^1H NMR-Daten von Aklanonsäure und Aklanonsäuremonomethylester

Meßfrequenz: 200 MHz, Lösungsmittel: CDCl_3

	Aklanonsäure	Aklanonsäuremonomethylester
1-H:	7,84 D,D (A)	7,83 D,D (A)
2-H:	7,71 T (B)	7,69 (B)
3-H:	7,32 D,D (C)	7,31 D,D (C)
	$J_{AB} = 8 \text{ Hz}$	$J_{AB} = 8 \text{ Hz}$
	$J_{AC} = 1,7 \text{ Hz}$	$J_{AC} = 1,7 \text{ Hz}$
	$J_{BC} = 8 \text{ Hz}$	$J_{BC} = 8 \text{ Hz}$
11-H:	7,83 S	7,75 S
4-OH:	12,70 S	12,54 S
6-OH:	11,89 S	11,90 S
7-OH:		15,40 S, v ^{a)}
8-H:	6,04 S	5,91 S
CH_2 (2 × 10-H)	3,86 S	3,84 S
CH_2 von C_2H_5	2,47 Q (A_2)	2,44 Q (A_2)
CH_3 von C_2H_5	1,21 T (X_3)	1,19 T (X_3)
	$J_{AX} = 7,5 \text{ Hz}$	$J_{AX} = 7,5 \text{ Hz}$
OCH_3		3,71 S

a) Signal nur mit 200 MHz-Gerät nachweisbar.

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

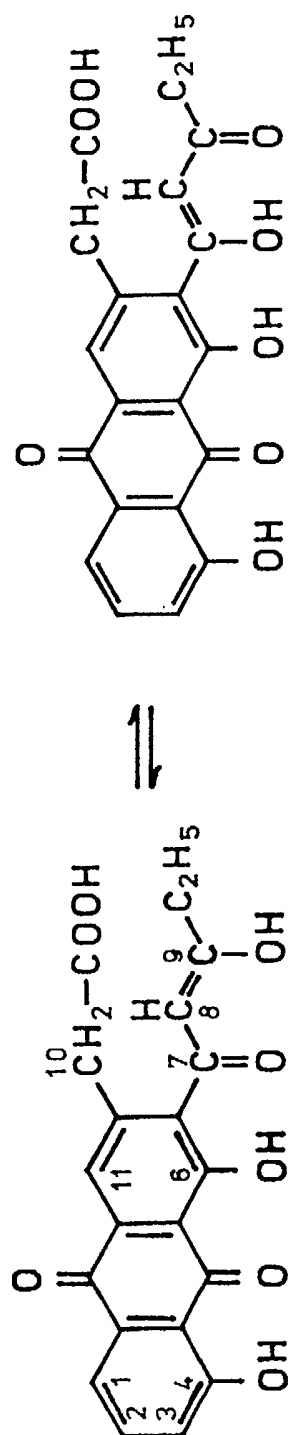


Abb. 1