



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 226 590 A1

4(51) C 12 N 1/00
A 61 L 2/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 267 103 8

(22) 07.09.84

(44) 28.08.85

(71) Karl-Marx-Universität Leipzig, Direktorat für Forschung, 7010 Leipzig, Goethestraße 3–5, DD
(72) Stenz, Eckart, Doz. Dr. sc. nat. ao.; Barth, Alfred, o. Prof. Dr. sc. nat.; Kempter, Gerhard, o. Prof. Dr. rer. nat. habil.; Menzel, Gisela, Dr. sc. nat.; Schuster, Gottfried, o. Prof. Dr. sc. nat., DD

(54) Mittel zur Phagenhemmung in mikrobiellen Produktionsprozessen

(57) Die Erfindung betrifft Mittel zur Hemmung von DNA- und RNA-Phagen in mikrobiellen Produktionsprozessen und damit zur Stabilisierung biotechnologischer Verfahren. Die Aufgabe bestand im Auffinden chemischer Wirkstoffe, die nach Zusatz zu Produktionsansätzen aufgrund ihrer chemischen Konstitution Phagen inaktivieren und/oder deren Vermehrung hemmen, so daß phagenbedingte Prozeßstörungen verhindert werden. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Mittel verwendet werden, die unterschiedlich substituierte Piperidinoacetanilide oder von diesen hergeleitete Verbindungen enthalten. Die erfindungsgemäßen Mittel werden den Fermentationsansätzen direkt oder in gelöster Form zugesetzt. Sie können auch Lösungsvermittler und/oder weitere Formulierungshilfsmittel enthalten. Die erfindungsgemäßen Verbindungen wirken gegen verschiedene DNA- und RNA-Phagen in unterschiedlichen Wirten und sind besonders wegen ihres breiten Wirkungsspektrums zur Sicherung phagengefährdeter Produktionsprozesse geeignet.

Titel der Erfindung

Mittel zur Phagenhemmung in mikrobiellen Produktionsprozessen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die Stabilisierung der Produktion in phagengefährdeten biotechnologischen Prozessen, soweit diese unter Verwendung oder Gewinn von prokaryontischen Organismen (Bakterien, Cyanobakterien) betrieben werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Maßnahmen zur Verringerung oder Aussetzung des Phagenrisikos in mikrobiologisch-biotechnologischen Prozessen, die in zunehmendem Maße vor allem zur Stoffproduktion, Substanzwandlung und Erzeugung von Biomasse genutzt werden, kommt erhebliche Bedeutung zu. Phageninfektionen und ihre negativen Auswirkungen in bakteriellen Produktionsverfahren können mit gewisser Sicherheit durch aseptische ("sterile") Fermentation vermieden werden. Wegen der damit verbundenen beträchtlichen Kosten kann ein solches Verfahren nur für Produkte, bei denen ein hoher Preis tolerierbar ist (z. B. Antibiotika) angewendet werden. Darüber hinaus sind auch in Sterilverfahren Phageneinbrüche, z. B. durch technische Mängel oder lysogene Bakterienstämme, die Phagen in Form von Prophagen in den Bakterienzellen selbst enthalten, möglich.

Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung des Phagenrisikos besteht in der Gewinnung und Nutzung von Bakterien-Mutanten, die sich durch Resistenz gegenüber einem oder mehreren Phagen auszeichnen. Die Grenzen dieser Methode liegen darin,

- daß es keine Resistenz gegen alle Phagen eines Bakterienstammes gibt,
- daß die resistenten Mutanten zumeist keine Hochleistungstämmen sind,
- und daß die Phagen ihrerseits wieder mutieren und somit die Resistenz der Wirtsorganismen durchbrechen können

(z. B. S. Seto, T. Osawa und S. Yamamoto, Agr. Biol. Chem. 32, 261 - 266, 1968; T. Oki und A. Ozaki, Agr. Biol. Chem. 32, 320 - 328, 1968).

Analog zur Virus-Chemotherapie bzw. -prophylaxe bei anderen Organismen ist auch für Mikroorganismen die direkte Bekämpfung der Phagen mittels geeigneter Chemikalien vorgeschlagen worden. Diese hat jedoch bisher ebenfalls nur zu Teilerfolgen geführt. Beispiele dieser Art sind der Einsatz von Calcium-bindenden bzw. chelatisierenden Substanzen, reduzierenden Chemikalien, Basenanaloga, Aminosäuren, Antibiotika oder anderen Verbindungen gegen Phagen, die als Schadfaktoren bei der mikrobiellen Herstellung von Aceton und Butanol, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Antibiotika, Milchprodukten, Biomasse u. a. aufgetreten waren (Übersicht bei V. Rudolph, Process Biochem. 1978, S. 16 u. 26; weitere Beispiele: N. Kashima et al., Agr. Biol. Chem. 40, 41 - 47, 1976; H. Lipavská et al., Folia microbiol. 23, 60 - 63, 1978). Der generellen Anwendung solcher Mittel steht entgegen, daß die Substanzen in der phagenwirksamen Konzentration auch die Bakterienvermehrung des Produktionsstammes selbst hemmend beeinflussen können. Ein weiterer Nachteil besteht in der Phagenspezifität der Mittel. Die aufgeführten Verbindungen wirkten jeweils nur gegen einen oder wenige biotechnologisch bedeutsame Phagen. Beispielsweise hat das als Phageninhibitor für *Bacillus subtilis* angegebene Indol (T. Ukita und K. Kusai, Jap. Pat. No. 32 - 1097, 1957) nach eigenen Untersuchungen keinen Einfluß auf die Vermehrung von PZ-Phagen in einem Produktionsstamm dieser Bakterienart. Auch die inzwischen entwickelten Phageninhibitoren mit breiterem Wirkungsspektrum (B. Kiesel et al., DD-~~1~~AP 73 4 37, 1981;

1
sind nicht in allen potentiell möglichen Produktionsstämmen anwendbar und nicht gegen die Gesamtheit aller Phagen wirksam. Die selbständig oder im Rahmen integrierter Maßnahmen anzuwendende Chemoprophylaxe bzw. -therapie phagaler Infektionen in mikrobiellen Produktionsprozessen erfordert daher eine möglichst umfangreiche Palette unterschiedlicher Phageninhibitoren.

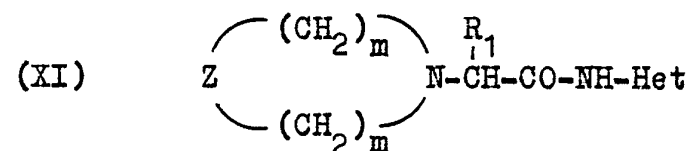
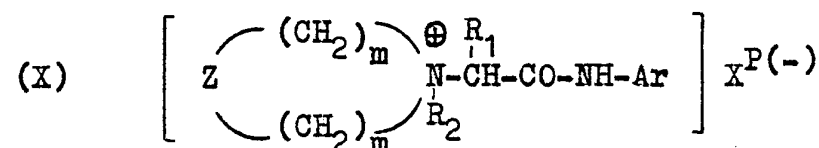
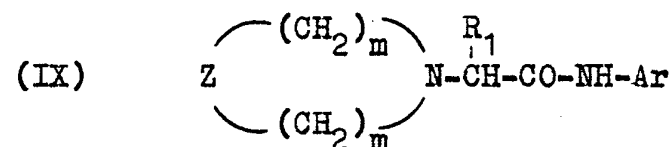
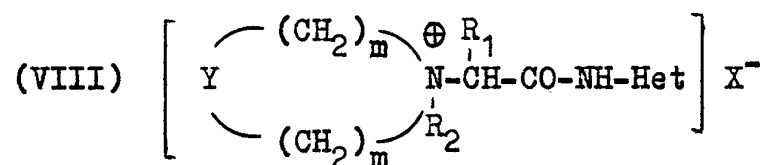
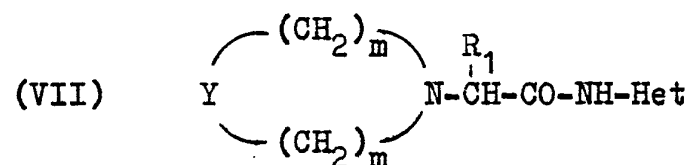
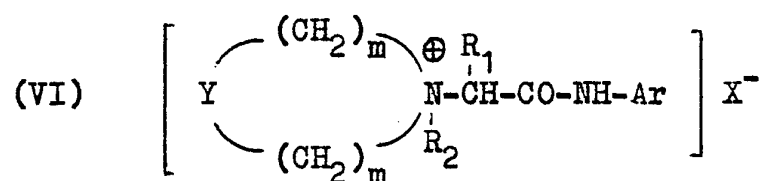
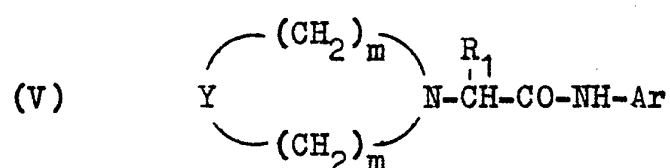
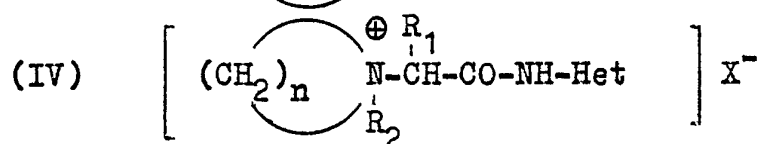
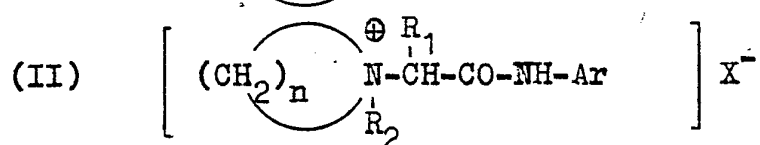
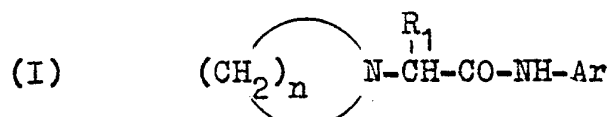
Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, das bei mikrobiellen Produktionsverfahren bestehende Phagenrisiko und die damit verbundenen Produktionsausfälle bzw. -minderungen durch den Einsatz neuartiger chemischer Phageninhibitoren zu verringern, die sich von den bisher bekannten in ihrem Wirkungsspektrum unterscheiden, vor allem indem sie sowohl gegen Desoxyribonukleinsäure (DNA) - Phagen als auch gegen Ribonukleinsäure (RNA)-Phagen vieler Wirtsorganismen wirksam sind, so daß bei gleichzeitiger Wirtsverträglichkeit eine umfassendere Anwendung in der Biotechnologie als selbständige Maßnahme wie auch im Rahmen integrierter antiphagaler Regimes möglich ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, chemische Wirkstoffe einzusetzen, die aufgrund ihrer chemischen Konstitution die Phagenvermehrung hemmen ohne die Wirtsorganismen (Produktionsstämme) zu beeinträchtigen, hierdurch eine antiphagale Prophylaxe bzw. Therapie ermöglichen und die Erträge von mikrobiellen Wachstums- und Syntheseprozessen stabilisieren. Die chemischen Wirkstoffe sollen ein breites Wirkungsspektrum gegen unterschiedliche Vertreter sowohl der DNA- als auch der RNA-Phagen aufweisen und damit einen phagengefährdeten Produktionsstamm vor unterschiedlichen Schadphagen und ggf. auch deren Mutanten wirksam schützen. Darüber hinaus sollen entsprechende Inhibitoren auch zum Schutz unterschiedlicher mikrobieller Produktionsprozesse einsetzbar sein.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß zur Phagenbekämpfung in mikrobiologisch-technischen Produktionsprozessen Mittel verwendet werden, die Verbindungen der allgemeinen Formeln



Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formeln (I) bis (XII) zeigen in unterschiedlichen Phagen/Prokaryonten-Systemen antiphagale Wirkungen, z. B. in den DNA-Phagen-Systemen

PZ-A	/Bacillus subtilis,
PZ-B	/Bacillus subtilis
λ	/Escherichia coli C 600
LPP-1	/Plectonema boryanum

und den RNA-Phagen-Systemen

M 12	/Escherichia coli W 1665 F ⁺ und
QB	/Escherichia coli AB 301.

Um die Schädigung von Phagen in Flüssigkulturen (Fermentationsbrühen) von Bakterien-Produktionsstämmen (Stagnieren bzw. Abnahme der Zellkonzentration) aufzuheben, werden die Mittel in solchen Mengen den Kulturmedien zugesetzt, daß sich eine Wirkstoffkonzentration von 10^{-6} bis 10^{-3} g/ml ergibt.

Ausführungsbeispiele

Zur Kennzeichnung der antiphagalen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen wurde der Plauehemmtest mit Agarkulturen in der Variante des Diffusions-Lochplattentests eingesetzt. Bei der Auswahl der Testsysteme wurden möglichst unterschiedliche Phagen berücksichtigt: virulent oder temperent, Zugehörigkeit zu unterschiedlichen morphologischen Gruppen, Nukleinsäuretyp DNA oder RNA, zur Phagenvermehrung notwendige Wirtsorganismen grampositiv oder gramnegativ, ihre Ernährungsweise heterotroph oder autotroph. Dabei wurden auch in biotechnologischen Prozessen als Schadfaktoren aufgetretene Bakteriophagen mit einbezogen.

Es fanden im wesentlichen die folgenden DNA-Phagen/Wirt-Systeme Verwendung:

PZ-A	/Bacillus subtilis
------	--------------------

Phage virulent ("pseudotemperent"), morphologische Gruppe C, Wirt grampositiv, heterotroph;
Produktionsstamm

PZ-B / *Bacillus subtilis*

Phage virulent, morphologische Gruppe A,
Wirt grampositiv, heterotroph; Produktionsstamm

λ / *Escherichia coli* C 600

Phage temperent, morphologische Gruppe B,
Wirt gramnegativ, heterotroph

LPP-1 / *Plectonema boryanum*

Phage virulent, morphologische Gruppe C
Wirt gramnegativ, photoautotroph; Cyanobakterium

Darüber hinaus wurden folgende RNA-Phagen/Wirt-Systeme in die Untersuchungen einbezogen:

M 12 / *Escherichia coli* W 1665 F⁺

Phage virulent, morphologische Gruppe E, serologische Gruppe I, Wirt gramnegativ, heterotroph

QB / *Escherichia coli* AB 301

Phage virulent, morphologische Gruppe E, serologische Gruppe III,
Wirt gramnegativ, heterotroph.

Der Plauehemmtest wurde als Agardiffusions-Lochtest ausgeführt. Zur Herstellung der Doppelschichtplatten wurde der noch flüssige Deckschichtagar bei 48 °C mit Phagen und Wirtsorganismen beimpft und auf die bei 37 °C für 30 min vorgetrocknete Grundschrift aufgegossen. In die Nährböden wurden nach ihrem Erstarren Löcher von 10 mm Durchmesser gestanzt und mit 0,05 ml einer 0,1molaren, in einigen Fällen auch 1%igen Lösung der Testsubstanzen gefüllt. Nach einstündiger Diffusionszeit bei Zimmertemperatur wurden die Platten inkubiert (PZ-Phagen bei 28 °C, λ , M 12 und QB bei 37 °C und LPP-1 bei 25 °C und

1400 lx). Durch die Diffusion der Testverbindungen im Agar-substrat bildet sich in radialer Richtung ein Konzentrationsgradient aus, in dessen wirksamen Bereichen eine Phagenhemmung als plaquelfreie Zone bzw. Zone mit weniger und/oder kleineren Plaques erkannt werden kann. Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen der radialen Breiten dieser Plaquehemmzonen. Alle Ansätze bestanden aus drei bis fünf Parallelen und wurden meist mehrfach wiederholt. Die in der beschriebenen Weise durchgeführten und ausgewerteten Versuche zeigen, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen in den unterschiedlichen Testsystemen beachtliche Plaquehemmzonen (also Bereiche mit Hemmung der Phagenvermehrung) hervorrufen und somit antiphagal gegen sehr unterschiedliche DNA-Phagen und auch RNA-Phagen wirken. In den Beispielsreihen 1 bis 3 sind einige diesbezügliche Ergebnisse mit DNA-Phagen und in Beispielsreihe 4 solche mit RNA-Phagen zusammengefaßt wiedergegeben.

Die angeführten Beispiele zeigen, daß viele der erfindungsgemäßen substituierten Piperidinoacetanilide, z. B. Piperidinoacetanilidhydrobromid und 4-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid, gegen zahlreiche Phagen wirksam sind. Aus der zum Teil beachtlichen Breite der Hemmzonen geht unter anderem hervor, daß sich die antiphagale Wirkung dieser Verbindungen über einen größeren Konzentrationsbereich erstreckt. Damit sind wichtige Vorbedingungen für den Einsatz zur Stabilisierung mikrobiologisch-biotechnologischer Produktionsprozesse erfüllt.

Beispielsreihe 1

Antiphagale Wirksamkeit erfindungsgemäßer Verbindungen gegen PZ-A- und PZ-B-Bakteriophagen im Lochtest mit *Bacillus subtilis*

Verbindung	Plaquehemm-	
	zone (radiale Ausdehnung in mm)	
	PZ-A	PZ-B
Piperidinoacetanilid-hydrobromid	6,3	3,0
3-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	3,7	3,0
4-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	5,3	5,7
3-Chlor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	3,0	2,7
3-Chlor-piperidinoacetanilid-hydrobromid	10,0	7,0
3-Trifluoromethyl-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	6,7	8,7
3-Ethoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	2,7	3,7
4-Ethoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	3,0	0
3-Nitro-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	2,7	3,3
4-Nitro-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	3,7	5,7
2-Chlor-(N-methyl)-piperidinoacetanilid-jodid	1,7	1,7
4-Methyl-(N-methyl)-piperidinoacetanilid-jodid	3,0	5,7
Morpholino-acetanilid-hydrobromid	0	2,0
4-Brom-piperidinoacetanilid	3,7	0
4-Methyl-(N-methyl)-morpholinium-acetanilid-jodid	6,7	0
Piperidino-acet-2-aminobenzaldehyd	4,7	1,7
$\begin{array}{c} \text{[]} \text{N-CH-CO-NH-} \langle \text{---} \rangle \text{-Br} \\ \text{CH}_3 \end{array}$	0	1,3

Beispielsreihe 2

Antiphagale Wirksamkeit erfindungsgemäßer Verbindungen gegen λ Bakteriophagen im Lochtest mit *Escherichia coli*

Verbindung	Plauehemzone (radiale Aus- dehnung in mm)
3-Chlor-piperidinoacetanilid-hydrobromid	4,7
4-Jod-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	1,7
3-Methyl-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	1,3
2-Methoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	1,0
3-Methoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	2,3
3-Ethoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	1,0

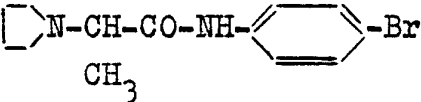
Beispielsreihe 3

Antiphagale Wirksamkeit erfindungsgemäßer Verbindungen
gegen LPP-1-Cyanophagen im Lochtest mit *Plectonema boryanum*

Verbindung	Plaquehemmzone (radiale Ausdehnung in mm)	
	plaquefrei	weniger u./oder kleinere Plaques
Piperidinoacetanilid-hydrochlorid	7,3	0
Piperidinoacetanilid-hydrobromid	6,3	12,0
2-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	18,7	3,0
4-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	16,0	6,0
3-Jod-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	9,0	0
4-Jod-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	12,0	0
2-Trifluoromethyl-piperidinoacetanilid- hydrochlorid	6,7	4,0
3-Methyl-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	22,0	0
3-Methyl-piperidinoacetanilid-hydrobromid	20,7	0
2-Methoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	9,7	0
3-Methoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	20,0	5,0
4-Methoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	16,7	0
3-Ethoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	17,0	4,7
4-Ethoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	19,7	5,0
3-Nitro-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	14,3	0
2-Chlor-(N-methyl)-piperidinium-acetanilid- jodid	5,7	0

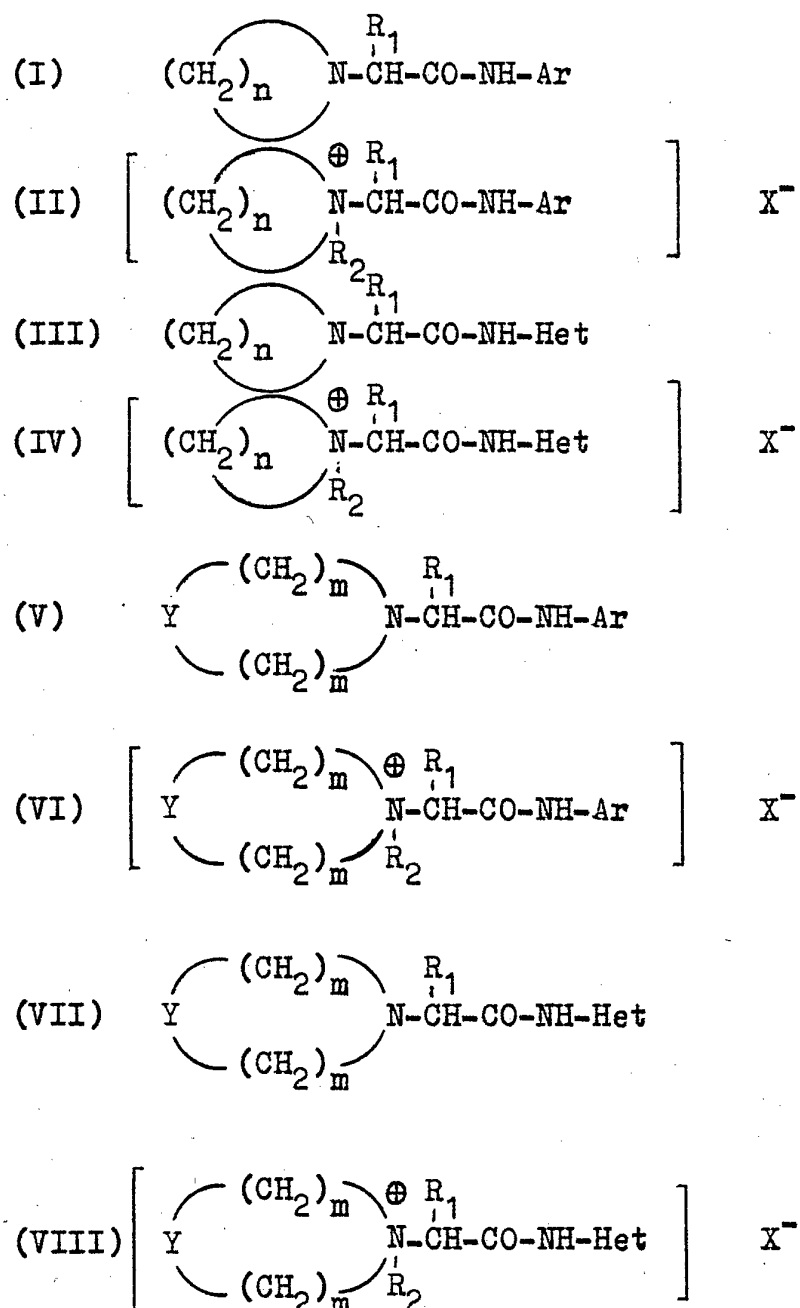
Beispielsreihe 4

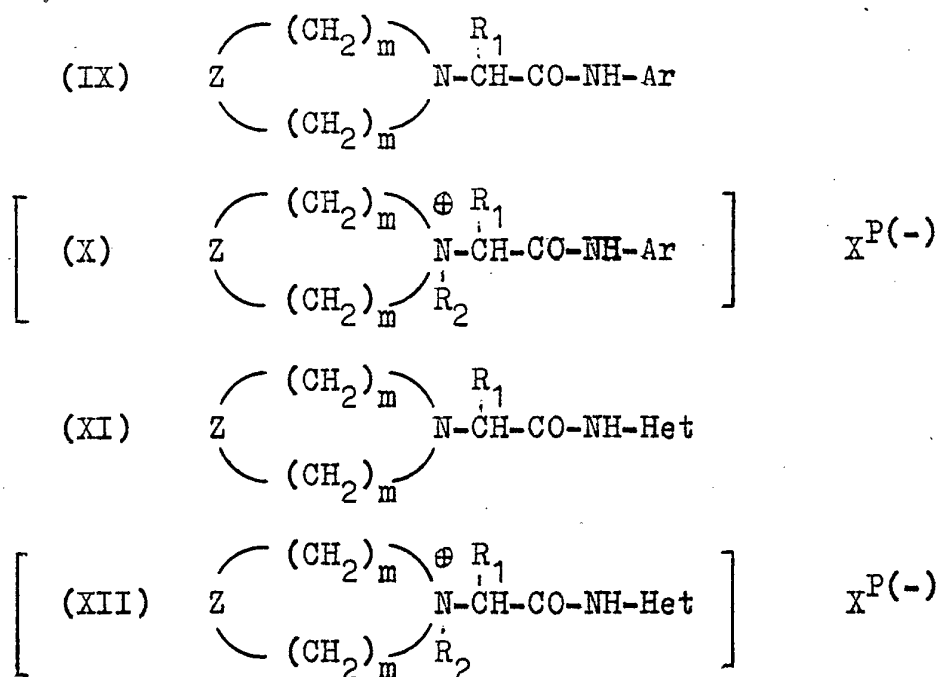
Antiphagale Wirksamkeit erfindungsgemäßer Verbindungen gegen
M12- und Qß-Bakteriophagen im Lochtest mit Escherichia coli

Verbindung	Plaquehemmzone (radiale Aus- dehnung in mm)	
	M12	Qß
Piperidinoacetanilid-hydrochlorid	4,0	4,0
Piperidinoacetanilid-hydrobromid	4,5	4,0
2-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	3,0	3,0
3-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	2,5	2,5
4-Fluor-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	3,0	2,5
3-Trifluormethyl-piperidinoacetanilid-hydro- chlorid	5,0	4,0
3-Methyl-piperidinoacetanilid-hydrobromid	2,5	2,5
3-Methoxy-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	3,0	3,0
4-Nitro-piperidinoacetanilid-hydrochlorid	4,0	3,0
Piperidinoacet-(4-pyridino)amid	3,0	3,5
4-Brom-piperidinoacetanilid	3,5	2,0
 N-CH-CO-NH-  -Br CH ₃	2,5	0

Erfindungsansprüche

1. Mittel zur Bakteriophagen- bzw. Cyanophagenbekämpfung in mikrobiologischen Produktionsprozessen, gekennzeichnet dadurch, daß antiphagale Wirkstoffe der allgemeinen Formeln (I) bis (XII)





⊕

wobei Y = O, S; Z = -NH, -NH-R₃ bzw. -N R₄, R₅); X = komplementäres Anion; R₁ = -H oder Alkylreste; R₂ = Alkylsubstituenten; R₃ = -H bzw. Alkylreste oder Acyl-, Sulfuryl-, Phosphoryl oder Phosphonylreste; R₄, R₅ = gleiche oder verschiedene Alkylreste bedeuten; Ar für den Benzenring oder verschieden substituierte Arylreste und Het für substituierte oder unsubstituierte Hetarylreste stehen, m = 2; n = 4, 5 und 6; p = 1, 2 sein können, zusammen mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen enthalten sind.

2. Mittel nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die antiphagalen Wirkstoffe einzeln oder in beliebiger Kombination miteinander vorliegen.
3. Mittel nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirkstoffkonzentration im Mittel zwischen 1 und 99 % liegt.
4. Mittel nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Lösungsvermittler und/oder Formulierungshilfsmittel enthalten sind.