



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTCHRIFT 147 113

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11)	147 113	(44)	18.03.81	3(51)	C 07 J 19/00
(21)	AP C 07 J / 216 490	(22)	26.10.79		
(31)	GO-1428	(32)	30.10.78	(33)	HU

(71) siehe (73)

(72) Albrecht, Karoly; Szeleczky, Zoltan, Prof. Dr.; Udvardy-Nagy, Eva, Dr.; Herpay, Maria, Prof.; Szabo, Istvan, Prof. Dr., HU

(73) Richter Gedeon Vegyészeti Gyár RT., Budapest, HU

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, 1130 Berlin, Frankfurter Allee 286

(54) Herstellung von 12 β -Hydroxy-cardenolidderivaten auf mikrobiologischem Wege

(57) 12 β -Hydroxy-cardenolide der sekundären Reihe werden auf mikrobiologischem Weg aus den entsprechenden 12-Desoxy-cardenoliden der primären Reihe hergestellt, indem man die letzteren mit submersen Kulturen der Stämme *Streptomyces purpurascens* KA-26 (MNG 179), *Str. purpurascens* KA-43 (MNG 178), *Str. purpurascens* KA-82 (MNG 177), *Str. purpurascens* KC-157 (MNG 176) oder *Str. alboniger* AB-318-ST (MNG 180), welche unter den angegebenen MNG-Nummern in der Nationalen Mikroorganismensammlung des Ungarischen Landesinstituts für Volkhygiene deponiert wurden, fermentiert und das umgesetzte Produkt aus der Fermentationsflüssigkeit auf an sich bekannte Weise isoliert.

Herstellung von 12 β -Hydroxy-Cardenolidderivaten auf mikrobiologischem Wege

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur mikrobiologischen Herstellung von Cardenoliden der allgemeinen Formel (I), worin Y Wasserstoff oder eine Hydroxylgruppe und R Wasserstoff oder eine Gruppe der Formeln (IV) oder (V) bedeuten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Es ist bekannt, daß einige Cardenolide pflanzlichen Ursprungs, z.B. das Lanatosid-C und das Digoxin unmittelbar als Arzneimittel verwendet werden können, während andere, wie das Lanatosid-A, das Acetyldigitoxin und das Digitoxin, nur durch vorherige chemische oder mikrobiologische Umset-

zung in eine therapeutisch verwendbare Form gebracht werden können. Diese Umsetzungen bezwecken die Abspaltung der Glucose- bzw. Acetylgruppe der primären Glykoside, besonders aber die Hydroxylierung der 12-Desoxy-glykoside.

Derartige Umsetzungsverfahren sind bereits bekannt. Ein Hydrolyseverfahren ist z.B. in der ungarischen Patentanmeldung Nr. GO-1416 beschrieben; nach diesem Verfahren kann das Lanatosid-A auf mikrobiologischem Wege, durch die Anwendung von *Streptomyces griseolus* in Digitoxin überführt werden.

Nach den japanischen Patentschriften 42 24 498, bzw. 42 22 611 bis 42 22 614 kann Digitoxin durch Hydroxylierung mit Hilfe von *Streptomyces diastatochromogenes*, *Streptomyces owasien-sis*, *Trichocladium asperum*, *Mortierella isabellina* bzw. *Circinelle muscae* Stämmen in Digoxin überführt werden.

Nach der ungarischen Patentanmeldung Nr. GO-1405 werden aus Digitoxin bzw. Acetyldigitoxin mit Hilfe einer submersen Kultur von *Streptomyces praecox* Digoxin und Acetyldigoxin hergestellt.

Ziel der Erfindung:

Die Zielsetzung der vorliegenden Erfindung war die Schaffung eines neuen Verfahrens, nach welchem Cardensolide der primären und sekundären Reihen in einem einzigen Fermentationsschritt in 12 β -Hydroxylgruppen enthaltende Cardenolide der sekundären Reihe überführt werden können

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Die Erfindung stammt aus der Erkenntnis, daß einige aus verschiedenen Böden isolierte Strahlenpilzkulturen, und zwar die Stämme KA-43, KA-82, KC-157 und AB-318-ST neben der 12-Oxygenase-Aktivität auch β -Glykosidase- und Desacetylase-Aktivität besitzen.

Die wichtigsten diagnostischen Merkmale dieser Stämme wurden im Vergleich mit der Beschreibung von typischen Stämmen nahe verwandter Pilzarten auf Grund der nachstehend ausführlich beschriebenen Untersuchungen bestimmt.

Morphologie des Stammes AB-318 ST:

Die Sporenträger sind vom Typ Rectus flexibilis, lang, gerade, mit mehr als 50 Sporen je Sporenkette. Diese morphologischen Eigenschaften sind an Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar, Haferflocken-Agar, Glycerin-Asparagin-Agar und an anorganische Salze enthaltendem Stärke-Agar beobachtbar. Nach elektronenmikroskopischen Beobachtungen haben die Sporen eine glatte Oberfläche. Die Farbe der Luftmyzelien gehört nach den vergleichenden Untersuchungen mit dem Tresner-Backus'schen Farbenrad zur Serie "White" (W). Auf sämtlichen oben erwähnten Standard-Nährböden ist diese Farbe identifizierbar. Das Substrat-Myzel zeigt auf verschiedenen Nährböden die folgenden Farben: Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar: graugelb (Co 81), Yb, Haferflocken-Agar: nicht bestimmbar, Glycerin-Asparagin-Agar: gelb (Co 68; Co 70) Y-b, Stärke-Agar mit anorganischen Salzen: gelb (Co 37; Co 67) Y-b. Das Pigment des Substrat-Myzels hat keinen Indikatorcharakter. Auf den oben erwähnten Nährböden kann keine Exopigmentbildung beobachtet werden.

Auf Pepton-Eisen-Agar und auf Tyrosin-Agar wird kein Pigment vom Melanin-Typ gebildet; die Melanoidpigment-Reaktion ist negativ.

Die folgenden Kohlehydrate werden gut verwertet: d-Glucose, 1-Arabinose, d-Xylose, i-Inosit, Mannit, d-Fructose und Raffinose; Saccharose und Rhamnose werden nicht verwertet.

Die wichtigsten diagnostischen Merkmale des Stammes AB-318-ST wurden in der nachstehenden Tabelle 1 zusammengefaßt und mit den entsprechenden Merkmalen eines Stammes vom Streptomyces alboniger Typ (ISP 5043) verglichen.

Tabelle 1

	Streptomyces AB-318-ST	Streptomyces alboniger ISP 5043
Sporenträger-Morphologie	RF	RF
Sporenoberfläche "	glatt	glatt
Farbe des Luftmyzels	W	W
Farbe des Substratmyzels	Y-b	Y-b
Indikator-Charakter des Substratmyzels	-	-
Lösliches Pigment	-	-
Indikator-Charakter des löslichen Pigments	-	-
Melanoidpigment M6	-	-
" M7	-	-
Kohlehydratverwertung:		
d-Glucose	+	+
l-Arabinose	+	+
d-Xylose	+	abweichende Resultate
i-Inosit	+	+
Mannit	+	+
d-Fructose	+	abweichende Resultate
Saccharose	-	-
Rhamnose	-	-
Raffinose	+	abweichende Resultate

Die in der obigen und in den nachfolgenden Tabellen verwendeten Zeichen bzw. Abkürzungen haben die folgenden Bedeutungen:

RF : Sporenträger vom Rectus-flexibilis Typ
RA : " " Retinaculum-apertum "
S : " " Spira "
M2 : Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar
M3 : Haferflocken-Agar
M4 : Stärke-Agar mit anorganischen Salzen
M5 : Glycerin-Asparagin-Agar
M6 : Pepton-Hefeextrakt-Eisen-Agar
M7 : Tyrosin-Agar

Die Daten der Farbenserie sind nach den Bezeichnungen der Tresner-Backus'schen Farbenbestimmung angegeben [Tresner u. Backus: Appl. Microbiol. 11, 335 (1963); E. Küster: Int. Bull. Bact. Nom. Tax. 14, 1 (1964)7.

Auf Grund der obigen Daten wurde der Stamm AB-318-ST als Streptomyces alboniger bestimmt und in der Ungarischen Nationalen Mikroorganismensammlung unter Nr. MNG 180 deponiert.

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die charakteristischen Eigenschaften der Stämme Streptomyces sp. KA-26, Streptomyces sp. KA-43, Streptomyces sp. KA-82 und Streptomyces sp. KC-157 zusammengefaßt.

Tabelle 2

	KA-26	KA-43	KA-82	KC-157
Sporenträger- Morphologie	M2	RA	S	RA
	M3	S	S	S
	M4	S	S	S
	M5	RA	S	RA
		stachlig	stachlig	stachlig
Farbe des Luftmyzels	M2	R(7ca): V(11ca)	R(7ca): V(11ca)	R(7ca):V(11ca)
	M3	R(5ca)	R(5ca)	R(5ca)
	M4	R(7ca;3ca)	R(7ca;3ca)	R(5ca;7ca)
	M5	W(13ba)	W(13ba)	W(13 ba)
		Y-b+blue	Y-b+blue	Y-b+blue
Farbe des Substratmyzels		--red	--red	--red
		von purpur in rot	von purpur in rot	von purpur in rot
Indikator- charakter des Substrat- myzels	HC2	von purpur in rot	von purpur in rot	von purpur in rot
	NaOH	von purpur in blau	von purpur in blau	von purpur in blau

Tabelle 2 (Fortsetzung)

	KA-26	KA-43	KA-82	KC-157
Lösliches Pigment				
M2	violett	blass-violett	violett	violett
M3	blau	blau	blau	blau
M4	violett	violett	violett	violett
M5	blass-violett	blass-violett	blass-violett	blass-violett
Indikator- charakter des löslichen Pigments				
HC2	von violett in orange	von violett in orange	von violett in orange	von violett in orange
NaOH	von violett in blau	von violett in blau	von violett in blau	von violett in blau
Melanoides Pigment				
M6	+	+	+	+
M7	-	-	-	-
Verwertung von Kohlen- stoffquellen				
d-Glucose	+	+	+	+
e-Arabinose	+	+	+	+
d-Xylose	+	+	+	+
l-Inosit	+	+	+	+
d-Mannit	+	+	+	+
d-Fructose	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+

Wie aus den obigen Daten ersichtlich ist, zeigen die in der Tabelle 2 beschriebenen Stämme völlige taxonomische Identität unter einander. Die Sporenträger gehören morphologisch zum "Spira" Typ, nur auf den Nährböden bzw. M5 zeigt sich gelegentlich der Typ "Retinaculum-apertum". Sowohl das Substratmyzel als auch das lösliche Pigment haben Indikator-Charakter.

In der nachstehenden Tabelle 3 sind die Standard-Beschreibungen der Stämme KA-26, KA-43, KA-82 und KC-157, sowie eines Stammes von *Streptomyces purpurascens* Typ (ISP 5310) zusammengefaßt.

T a b e l l e 3

	Streptomyces sp. KA-26, KA-43, KA-82, KC-157	Streptomyces purpurascens ISP 5310
Sporenträger (Morphologie)	S	S
Sporenoberfläche "	stachelig	stachelig
Farbe des Luftmyzels	R(3ca;5ca;7ca) V(11ca)	R;W
Farbe des Substratmyzels	Y-b+blue -- red	Y-b+blue -- red
Indikator-Charakter HCl	von violett in purpur	von purpur in rot
NaOH	von rot in violett	von purpur in blau
Lösliches Pigment	rot: blau	violett

T a b e l l e 3 (Fortsetzung)

Indikator-Charakter des löslichen Pigments		wie bei dem Substratmyzel	
Melanoides Pigment	M6	+	+
	M7	-	-
d-Glucose		+	+
l-Arabinose		+	+
d-Xylose		+	+
i-Inosit		+	+
Mannit		+	+
d-Fructose		+	+
Saccharose		+	+
Rhamnose		+	+
Raffinose		+	+

Auf Grund der Übereinstimmung der wichtigsten diagnostischen Merkmale, wurden die obigen Stämme als *Streptomyces purpurascens* identifiziert; der Stamm *Streptomyces purpurascens* KA-26 wurde unter Nr. MNG 179, der Stamm *Streptomyces purpurascens* KA-43 unter Nr. MNG 178, der Stamm *Streptomyces purpurascens* KA-82 unter Nr. MNG 177 und der Stamm *Streptomyces purpurascens* KC-157 unter Nr. 176 in der Ungarischen Nationalen Mikroorganismensammlung deponiert.

Die Erfindung ist also ein Verfahren zur Herstellung von Cardenoliden der oben definierten allgemeinen Formel (I) auf mikrobiologischem Wege, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein Cardenolid der allgemeinen Formel (IA), worin X Wasserstoff oder eine Hydroxylgruppe, und R¹ Wasserstoff oder eine Gruppe der Formeln (II), (III), (IV) oder (V) bedeuten mit der Beschränkung, daß falls X eine Hydroxylgruppe bedeutet, R¹ nur eine Gruppe der Formel (II) be-

deuten kann, und in dem Endprodukt der Formel (I) R nur für eine Gruppe der Formel (IV) oder (V) stehen kann, mit einer submersen Kultur der Stämme *Streptomyces purpurascens* KA-26 (MNG 179), *Streptomyces purpurascens* KA-43 (MNG 178), *Streptomyces purpurascens* KA-82 (MNG 177), *Streptomyces purpurascens* KC-157 (MNG 176) oder *Streptomyces alboniger* AB-318-ST (MNG 180), welche unter den angegebenen Nummern in der Nationalen Mikroorganismensammlung des Ungarischen Landesinstituts für Volkshygiene deponiert wurden, fermentiert und das umgesetzte Produkt aus der Fermentationsflüssigkeit auf an sich bekannte Weise isoliert.

Bei der praktischen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die wichtigste Bedingung, daß man unter aseptischen Bedingungen arbeitet. Die genannten *Streptomyces*-Stämme können übrigens unter den bei der Züchtung von Strahlenpilzen allgemein üblichen Bedingungen gezüchtet werden.

Kraftvolles Wachstum wird erreicht, wenn man als Kohlenstoff- und Energiequelle die oben erwähnten Zucker verwendet, welche von diesen Stämmen gut verwertet werden können, wie z.B. Glucose, Arabinose, Xylose, Mannit, Fructose, Saccharose oder Raffinose. Als Stickstoffquelle können Haselnußmehl, Maisquellwasser, Pepton, ferner vorteilhaft Sojamehl, Casein oder Hydrolysate davon, Aminosäuren oder anorganische Ammoniumsalze verwendet werden.

Der pH-Wert des Nährbodens wird zwischen 6 und 8, vorteilhaft auf 7 eingestellt; zum Erhöhen der Pufferkapazität kann Calciumcarbonat zugesetzt werden.

Zur Vermeidung eines etwaigen Schäumens wird zum Nährboden, zweckmäßig schon vor dem Sterilisieren, ein pflanzliches Öl, vorteilhaft Palmenöl oder Sonnenblumenöl, oder ein synthetisches Schaumverhütungsmittel zugegeben. Der Nährboden wird bei 120 °C 30 bis 60 Minuten sterilisiert.

Das Züchten der Kultur und die Umsetzung werden zweckmäßig bei der für die Streptomyceten günstige Temperatur zwischen 30 ° und 40 °C, besonders bei 32 °C, durchgeführt; man kann aber auch bei der Züchtung der Kultur 32 °C und bei der Umsetzung 37 °C anwenden. Es ist wichtig, daß die submerse Kultur während des gesamten Vorgangs eine entsprechende Luftzufuhr erhalten muß, was durch das Schütteln des Kolbens bzw. durch ein entsprechendes Rühren der in den Fermentor eingeleiteten sterilen Luft erreicht werden kann.

Die Umsetzung des Substrats wird zweckmäßig mit einer schon kraftvoll entwickelten Kultur, etwa bei 1% Trockensubstanzgehalt des Fermentationsmediums begonnen; man kann aber mit der Zugabe des Substrats schon während des Wachstums der Kultur beginnen.

Die Zugabe des Substrats zum Fermentationsmedium geschieht in Form einer Lösung, die mit einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, das die Umsetzung nicht hemmt, hergestellt wird, welche von der Zugabe durch Filtrieren oder Erwärmen sterilisiert wird. Bei der Zugabe des Substrats kann vorteilhaft das in der ungarischen Patentanmeldung GO-1427 beschriebene Verfahren angewendet werden; so kann durch eine entsprechende Wahl des zu verwendenden Lösungsmittels die Konzentration des Substrats im Fermentationsmedium erheblich gesteigert werden.

Das Fortschreiten der Umsetzung kann mit Hilfe von entnommenen Proben verfolgt werden; nach dünnschichtchromatographischer Trennung wird der Cardenolidgehalt der Proben durch photometrische Messung der mit Dixanthylharnstoff erhaltenen Farbe ermittelt. Die praktische Ausführungsweise dieser Methode ist ebenfalls in der oben zitierten ungarischen Patentanmeldung GO-1427 sowie auch im nachstehenden Beispiel 1 ausführlich beschrieben.

Die Fermentation kann beendet werden, wenn die erwähnte analytische Prüfung den völligen Verbrauch des Substrats und das maximale Anwachsen der Menge des gewünschten Produktes zeigt. Dann wird die Fermentationsflüssigkeit abfiltriert und das erhaltene Produkt mit einem organischen Lösungsmittel aus der Zellenmasse bzw. aus der Fermentationsflüssigkeit extrahiert. Der trockene Rückstand des Extrakts kann durch Chromatographieren bzw. durch Umkristallisieren gereinigt werden. (Bei der Reinigung können die entstandenen Nebenprodukte vorteilhaft durch Anwendung des in der ungarischen Patentanmeldung GO-1393 beschriebenen Verfahrens abgetrennt werden.)

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß man die Überführung von primären 12-Desoxycardenoliden in die entsprechenden sekundären, in der 12 β -Stellung eine Hydroxylgruppe enthaltenden Cardenolide anstatt der bisher erforderlichen zwei auf einander folgenden mikrobiologischen Umsetzungen in einem einzigen Fermentationsschritt durchführen kann. Der Wegfall von einem Fermentationsschritt bedeutet auch die Einsparung eines kostspieligen und Materialverluste verursachenden Extraktions- und Aufarbeitungsschrittes, so daß durch die Erfindung ein wesentlich einfacheres und höheres Ausbeuten lieferndes Herstellungsverfahren von 12 β -Hydroxy-cardenoliden ermöglicht wird.

Ein weiterer Vorteil ist, daß das energiekonsumierende Trocknungs-Fermentieren bei der Aufarbeitung des Drog, durch welches die Überführung der primären Glykoside in sekundäre Glykoside erreicht werden soll, bei der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ebenfalls wegfällt.

Durch die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann ferner die Herstellung des vom therapeutischen Gesichtspunkt wichtigsten Digoxins unabhängig von der schwankenden Glykosidzusammensetzung der Droge (also von dem Wert des Verhältnisses Gesamtglykoside/Lanatosid-C) immer gesichert werden.

Als weiterer Vorteil ist es noch zu erwähnen, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht nur die Lanatoside, sondern auch die Purpurea-Glykoside in therapeutisch hochwertige Produkte überführt werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die nachstehenden Beispiele näher veranschaulicht.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

Aus einer, auf schrägem Kartoffel-Dextrose-Agar gezüchteten, 3 bis 4 Wochen alten Kultur des Stammes *Streptomyces purpurascens* KA-43 (MNG 178) wird mit 10 ml sterilem Wasser eine Suspension hergestellt. In einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben wird 100 ml "PS" Nährboden sterilisiert. Zusammensetzung des PS Nährbodens:

0,8 % Sojapulver

3,0 % Glucose

pH-Wert vor der Sterilisierung: 7,0

Sterilisierung: 45 Minuten bei 120 °C. Die Glucose wird in 50 %iger wässriger Lösung separat sterilisiert (30 Minuten bei 120 °C). Das Sojapulver wird auf folgende Weise hergestellt: Aus einem durch ein Sieb von 0,4 mm Maschenweite extrahierten Sojagries wird mit Leitungswasser eine 10 %ige Suspension hergestellt und diese zuerst durch Erhitzen unter 1 Atü eine Stunde lang, dann auf 37 ° abgekühlt; mit 0,4 % Pankreatin 2 Stunden lang hydrolysiert, wobei der pH-Wert durch die Zugabe von Natronlauge zwischen 7,5 und 8,0 gehalten wird. Die Suspension wird dann zentrifugiert und die supernatante Flüssigkeit unter Zerstäubung zur Trockne eingedampft. Das auf diese Weise erhaltene, 9 % Stickstoff enthaltende Produkt ist das Sojapulver.

Der auf obige Weise hergestellte und sterilisierte Nährboden wird in dem Erlenmeyer-Kolben mit 1 ml der Mikroorganismen-Suspension geimpft und auf einer Flachsüttelmaschine mit 2,5 cm Ausschlag und 300 U/min bei 32 °C zwei Tage lang geschüttelt. Dann wird die Lösung von 50 mg Lanatosid-A in 0,5 ml Dioxan, welche vorher durch Filtrieren sterilisiert wurde, zugesetzt, der Kolben anschließend weitere 4 Tage bei 32 °C geschüttelt, und dann wird die auf diese Weise erhaltene Fermentationsflüssigkeit mit je 50 ml Chloroform zweimal extrahiert. Der Glykosidgehalt des Extrakt wird nach dünn-schichtchromatographischer Separierung durch photometrische Messung der mit Dixanthylharnstoff erhaltenen Farbe auf folgende Weise ermittelt:

Dünnschichtchromatographische Separierung: Auf einer 0,25 mm dicken Schicht von Kieselgel Merck HF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, BRD) in einer Wanne mit gesättigtem Dampfraum; Laufmittel bei primären Glykosiden Chloroform - Methanol 90:10, bei sekundären Glykosiden Äthylacetat - Cyclohexan - Abs. Äthanol 55:35:10. mit je drei Läufen.

Die zu untersuchenden Muster werden in solchen Mengen auf die Kieselgelschicht aufgetropft, daß in dem aufgetragenen Volumen 10 bis 50 µg der einzelnen Glykoside enthalten sind.

Nach den drei Läufen wird die Schicht sorgfältig getrocknet, und das Chromatogramm in Joddampf entwickelt. Die Flecke werden entsprechend den Standardmustern markiert und das Jod im Luftstrom wegsublimiert.

Farbenreaktion: Die markierten Flecke werden abgekratzt und in Epruvetten mit eingeschliffenen Glasstopfen gebracht. Je 3 ml Dixanthylharnstoff-reagens (s. unten) werden zugesetzt, die Epruvetten werden geschlossen, gründlich geschüttelt und drei Minuten lang in einem siedenden Wasserbad gehalten. Anschließend werden die Epruvetten in einem

kalten Wasserbad abgekühlt und nach Schütteln scharf zentrifugiert. Die Farbintensität der klaren supernatanten Flüssigkeit wird bei 535 nm gemessen im Vergleich mit einer glykosidfreien Lösung.

Die glykosidfreie Lösung wird durch Abkratzen eines "leeren" (keine Glykoside enthaltenden), in der selben Höhe wie das betreffende Glykosid befindlichen Flecks von gleich großer Fläche der Kieselgelschicht auf die oben beschriebene Weise hergestellt.

Aus den gemessenen Extinktionswerten können, unter Berücksichtigung der eventuellen Verdünnung und des aufgetragenen Volumens, mit Hilfe des aus der Standard-Konzentrationskurve gewonnenen Faktors die Konzentrationen der einzelnen Glykoside berechnet werden.

Dixanthylharnstoff-Reagens: 10 mg Dixanthylharnstoff werden in einem Gemisch aus 50 ml Essigsäure und 1 ml konzentrierter Salzsäure gelöst und die Lösung mit Essigsäure auf 100 ml aufgefüllt. Das Reagens wird vor der Messung jeweils frisch hergestellt.

Der nach der oben beschriebenen Methode bestimmte Digoxingehalt des auf obige Weise erhaltenen Extrakts ist 12 mg.

Beispiel 2

Es wird nach Beispiel 1 gearbeitet, mit dem Unterschied, daß anstatt von Lanatosid-A 50 mg Acetyldigitoxin, in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst, der Kultur zugegeben werden. Das auf diese Weise erhaltene Extrakt enthält 9 mg Digoxin.

Beispiel 3

Es wird nach Beispiel 1 gearbeitet, mit dem Unterschied, daß anstatt von Lanatosid-A 50 mg Purpureaglykosid, in 1 ml Tetrahydrofurfurylalkohol gelöst, der Kultur zugegeben werden. Das auf diese Weise erhaltene Extrakt enthält 8 mg Digoxin.

Beispiel 4

Es wird nach Beispiel 1 gearbeitet, mit dem Unterschied, daß anstatt von Lanatosid-A 50 mg Digitoxin, in 1 ml Dimethylsulfoxyd gelöst, der Kultur zugegeben werden. Das auf diese Weise erhaltene Extrakt enthält 8 mg Digoxin, während 15 mg Digitoxin unverändert geblieben sind.

Beispiel 5

Es wird nach Beispiel 1 gearbeitet, mit dem Unterschied, daß die Mikroorganismen-Suspensionen anstatt von Streptomyces purpurascens KA-43 (MNG 178) aus Kulturen folgender Mikroorganismenstämme hergestellt werden:

- Kolben 1: Streptomyces purpurascens KA-26 (MNG 179),
- Kolben 2: Streptomyces purpurascens KA-82 (MNG 177),
- Kolben 3: Streptomyces purpurascens KC-157 (MNG 176),
- Kolben 4: Streptomyces alboniger AB-318-ST (MNG 180).

Die, in den auf diese Weise erhaltenen Extrakten, gefundenen Mengen von Glykosiden sind in der nachstehenden Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4

Kolben	<u>Lanatosid-A</u>	<u>Ac-Digitoxin</u>	<u>Digitoxin</u>	<u>Digoxin</u>
	(mg)			
1	2,1	3,0	15,3	4,2
2	1,8	5,5	12,4	7,3
3	3,6	4,1	11,3	6,1
4	-	1,7	16,4	3,8

Beispiel 6

Es wird nach Beispiel 5 gearbeitet, mit dem Unterschied, daß anstatt von Lanatosid-A die Lösung von 50 mg Purpurea-glykosid-A in 1 ml Tetrahydrofurfurylalkohol den Kulturen zugegeben wird.

Die, in den auf diese Weise erhaltenen Extrakten, gefundenen Mengen von Glykosiden sind in der nachstehenden Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

Kolben	<u>Purpurea-glykosid</u>	<u>Digitoxin</u>	<u>Digoxin</u>
	(mg)		
1	1,7	18,2	4
2	--	14,3	6,8
3	2,8	12,7	7,2
4	3,5	15,8	4,1

Beispiel 7

Es wird nach Beispiel 5 gearbeitet, aber mit dem Unterschied, daß anstatt von Lanatosid-A die Lösung von 50 mg Acetyldigitoxin in 1 ml Dimethylsulfoxyd den Kulturen zugegeben wird. Die erhaltenen Mengen von Glykosiden sind in der nachstehenden Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

Kolben	Acetyldigitoxin	Digitoxin	Digoxin
	(mg)		
1	5,2	15,8	4,6
2	4,5	14,3	6,4
3	6,1	15,5	4,8
4	7,3	16,0	3,7

Beispiel 8

Es wird nach Beispiel 5 gearbeitet, aber mit dem Unterschied, daß anstatt von Lanatosid-A die Lösung von 50 mg Digitoxin in 1 ml Dimethylsulfoxyd den Kulturen zugesetzt wird. Die auf diese Weise gebildeten Mengen von Glykosiden sind in der nachstehenden Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7

Kolben	Digitoxin	Digoxin
	(mg)	
1	24,6	3,7
2	21,5	4,9
3	26,1	3,1
4	28,6	2,5

Beispiel 9

Es wird nach Beispiel 1 gearbeitet, aber mit dem Unterschied, daß die Fermentation 2 Tage nach der Zugabe des Substrats beendet wird. Die Fermentationsflüssigkeit wird mit Chloroform extrahiert. Das Extrakt wird auf einer Kieselgelschicht (Kieselgel HF₂₅₄, Merck, Darmstadt; Dicke: 0,25 mm) chromatographiert; Laufmittel: Cyclohexan - Äthylacetat - abs. Äthanol 35:55:10). Die Flecke wurden mit Essigsäure-Anisaldehyd-Reagens entwickelt. Auf dem erhaltenen Chromatogramm wurden neben wenig nicht umgesetzten Lanatosid-A erhebliche Mengen von Acetyldigitoxin, Adetyldigoxin und Digitoxin sowie wenig Digoxin identifiziert.

Beispiel 10

Aus einer, auf schrägem Kartoffel-Dextrose-Agar gezüchteten, 3 bis 4 Wochen alten Kultur des Stammes *Streptomyces purpurascens* KA-43 (MNG 178) wurde mit 10 ml sterilem Wasser eine Suspension hergestellt. In 500 ml Erlenmeyer-Kolben werden je 100 ml "PS" Nährboden sterilisiert und dann mit je 1 ml der Mikroorganismen-Suspension geimpft. Die Kolben werden bei 32 °C zwei Tage geschüttelt.

In einem Labor-Fermentor werden 5 Liter 0,2 % Palmenöl enthaltender "PS" Nährboden bei 120 °C 60 Minuten lang sterilisiert und nach dem Abkühlen mit dem vereinigten Inhalt von 4 Kolben geimpft.

Der Inhalt des in einem auf 32 °C erwärmten Wasserbad gehaltenen Fermentors wird unter Belüftung mit steriler Luft (5 l/min) und Rühren (350 U/min) einen Tag lang inkubiert und dann wird die durch Filtrieren sterilisierte Lösung von 5 g Lanatosid-A in 25 ml Dioxan zugesetzt. Nach weiterem 5 Tage langem Inkubieren wird die Fermentationsflüssigkeit abfiltriert.

Das zellenfreie Filtrat wird mit Benzol (1/3 des Volumens) zweimal extrahiert. Das mit Benzol erhaltene Extrakt enthält das eventuell unumgesetzte Substrat (Lanatosid-A) sowie das als Zwischenprodukt entstandene Digitoxin und einen Teil der Nebenprodukte.

Anschließend wird die mit Benzol extrahierte Fermentationsflüssigkeit dreimal mit je 1/3 des Volumens Chloroform extrahiert, das Extrakt mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum, bei höchstens 50 °C zur Trockne eingedampft. Der auf diese Weise erhaltene Rückstand enthält 40 % Digoxin, 14 % 7ß-Hydroxy-digoxin sowie weitere 20 % andere Glykoside mit nicht identifizierter Struktur. Lanatosid-A, Acetyldigitoxin bzw. Acetyldigoxin konnten im Rückstand nicht nachgewiesen werden.

Dieser Rückstand, des mit Chloroform erhaltenen Extrakts, wurde in einem Gemisch aus 60 ml Methanol und 60 ml Benzol gelöst, die Lösung mit 400 mg Phenylborsäure versetzt und 5 Minuten stehen gelassen. Dann wurde das Reaktionsgemisch unter ständigem Rühren mit 60 ml Wasser versetzt. Nach der Trennung der Phasen wurde die untere, wässrig-methanolische Schicht abgetrennt und mit 60 ml Benzol extrahiert. Die untere Schicht wurde abgetrennt, das Methanol im Vakuum, bei höchstens 50 °C entfernt, das sich ausscheidende kristalline Produkt abfiltriert, mit 60 ml Wasser gewaschen und getrocknet. Es wurden auf diese Weise 0,75 g kristallines Digoxin erhalten; $[\alpha]_{546}^{20} = + 13,6^{\circ}$ (c = 10 %, in Pyridin).

Beispiel 11

Es wird nach Beispiel 5 gearbeitet mit dem Unterschied, daß anstatt von Lanatosid-A 50 mg Lanatosid-C, in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst, der Kultur zugegeben werden.

Die in den auf diese Weise erhaltenen Extrakten gefundenen Glykoside sind in der nachstehenden Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Kolben	<u>Lanatosid-C</u>	<u>Digoxin</u>
	(mg)	
1	5,2	12,0
2	6,0	17,1
3	2,1	18,1
4	4,3	14,2

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Cardenoliden der allgemeinen Formel (I), worin Y ein Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe und R ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe der allgemeinen Formeln (IV) oder (V) bedeuten, auf mikrobiologischem Wege, gekennzeichnet dadurch, daß man ein Cardenolid der allgemeinen Formel (IA), worin X Wasserstoff oder eine Hydroxylgruppe und R^1 ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe der allgemeinen Formeln (II) oder (III) oder der Formeln (IV) oder (V) bedeuten mit der Beschränkung, daß falls X eine Hydroxylgruppe bedeutet, R^1 nur eine Gruppe der Formel (II) bedeuten kann, und in dem Endprodukt der Formel (I) R nur für eine Gruppe der Formel (IV) oder (V) stehen kann, mit einer submersen Kultur der Stämme *Streptomyces purpurascens* KA-26 (MNG 179), *Streptomyces purpurascens* KA-43 (MNG 178), *Streptomyces purpurascens* KA-82 (MNG 177), *Streptomyces purpurascens* KC-157 (MNG-176) oder *Streptomyces alboniger* AB-318-ST (MNG 180), welche unter den angegebenen MNG-Nummern in der Nationalen Mikroorganismensammlung des Ungarischen Landesinstituts für Volkshygiene deponiert wurden, fermentiert und das umgesetzte Produkt aus der Fermentationsflüssigkeit auf an sich bekannte Weise isoliert.

Hierzu 3 Seiten Formeln







