



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 251 350 7

(22) 30.05.83

(44) 28.11.84

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Koch, Wolfgang, Dipl.-Chem.; Ihn, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Fleck, Werner, Dr. habil. rer. nat.; Tresselt, Dieter, Dr. rer. nat.; Strauß, Dietrich, Dr. sc. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Alpharubicin II sowie seines Aglykons

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Alpharubicin II 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 neuen Anthracyclin-Antibioticums, Alpharubicin II, seiner Salze sowie seiner hydrolytischen Abbauprodukte unter Verwendung des Mikroorganismus, ZIMET 43 693, der nach Mutagenese aus Populationen der Art *Streptomyces violaceus* selektiert wurde. Ziel der Erfindung ist die Gewinnung eines Anthracyclin-Antibioticums mit potentiell cancerostatischen Eigenschaften sowie seiner hydrolytischen Abbauprodukte als Ausgangssubstrate für Mutasynthese und Halbsynthese, um die Palette derartiger Pharmaca zu erweitern. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des Mikroorganismus ZIMET 43 693 in Medien mit geeigneten C-, N-Quellen und Mineralsalzen Alpharubicin II gebildet, mit geeigneten Methoden aus Mycel und Kulturfiltrat isoliert und nachfolgend gereinigt und gegebenenfalls hydrolysiert bzw. in seine Salze übergeführt wird.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von Alharubicin II 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 potentiellern Nutzen sind. Insbesondere betrifft die Erfindung die Gewinnung eines Anthracyclin-Antibioticums, das als Alharubicin II bezeichnet wird, seiner Salze, sowie seines Aglykons.

Charakteristik der bekannten technischen Lösung

Anthracyclinon-Glykoside (=Anthracycline) stellen antibiotisch wirksame Verbindungen dar, deren chromophorer Molekülteil ein 7,8,9,10-Tetrahydrotetracenchinon (5,12) darstellt, das mit Zuckern, bevorzugt Aminoazuckern verbunden ist (Brockmann, H., 1963. Fortschr.Chem.Organ.Naturstoffe, 21, 121). Mehr als 100 Anthracycline sind bisher bekannt, wovon die Mehrzahl Gemische von schwer voneinander trennbaren Einzelkomponenten darstellen. Zwei 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 in klinischer Anwen-

... ..
dung. 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 Totel- und Partialsynthese sowie biochemische Methoden zur enzymatischen Konversion verfügbar sind, deren Anwendung jedoch zu einer unzureichenden Ökonomie der Produktherstellung führt, die eine großtechnische Gewinnung 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 unter industriellen 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 Aglykon dem α_2 -Rhodomycinon zugeordnet werden können, sind bisher lediglich mit Hilfe der Arten Streptomyces purpurascens (Brockmann und Niemeyer 1968, Chem.Ber., 101, 1371; Brockmann, Waehnelt und Niemeyer 1969, Tetrahedr.Lett., 6, 415), Streptomyces griseoruber 4620 (Podojil, Blumauerova et al., 1980, Folia Microbiol., 25, 464), Streptomyces violaceus (Fleck, Strauß, Koch, Kramer und Prauser, 1974, Z.Allg.Mikrobiol., 14, 551 auf fermentativem Wege als Gemische oder in einem Falle (Brockmann) als Minorkomponente mit unbekannter chemischer Struktur und chemotherapeutischer Aktivität erhalten worden. Aus den Rhodomycin-Gemischen, die α_2 -Rhodomycinon-Glykoside enthalten, wurde bisher lediglich das biologisch inaktive Aglykon α_2 -Rhodomycinon nach Totalhydrolyse isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. Angaben zu den

physikochemischen Eigenschaften der α_2 -Rhodomycinon-Glykoside sowie zu deren biologischer Wirkung wie antimikrobielle, antivirale, cytostatische und antitumorwirksame Aktivität liegen bisher lediglich zum Alharubicin I (Aktenzeichen WP C 12 D/245 188 8) 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, virostatistisch und antimikrobiell wirksamer Anthracycline durch einen Vertreter, der eine Einzelkomponente darstellt, zu erweitern, sowie um die hydrolytischen Abbauprodukte 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 technologisches Verfahren anzugeben, das es gestattet, das neue Anthracyclin-Antibioticum Alharubicin II mit Hilfe eines Mikroorganismus aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen in guten Ausbeuten herzustellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen in einem flüssigen Nährmedium mit entsprechenden Kohlenstoff-, Stickstoffquellen und Mineralsalzen ein Mikroorganismus oder seine Varianten und Mutanten gezüchtet werden. Der Mikroorganismus, der in dem vorliegenden Verfahren zur Herstellung von Alharubicin II verwendet wird, wurde durch Mutagenese-Selektionsprozesse aus Populationen der Art Streptomyces violaceus (Stamm IMET JA 6844) gewonnen und in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Jena-DDR, unter der Nummer ZIMET 43 693 hinterlegt.

Danach gehört der Alharubicin II-Bildner, ZIMET 43 693, 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 Ausgangsstamm IMET JA 6844 unterscheidet sich von der daraus abgeleiteten Mutante ZIMET 43 693 bezüglich der Anthracyclin-Biosynthese in sowohl qualitativer als auch quantitativer Hinsicht. Während der Ausgangsstamm IMET JA 6844 das in der Patentschrift (DDR-WP 100 494) beschriebene Anthracyclin-Antibioticum Violamycin zu bilden vermag, synthetisiert die nach Mutagenese selektierte Mutante ZIMET 43 693 bevorzugt das neue Anthracyclin-Antibioticum Alpharubicin II.

Die Kultivierung des Alpharubicin II-Bildners, ZIMET 43 693, sowie seiner Mutanten und Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. An Erde lyophil getrocknetes Sporenmaterial des Stammes wird 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, beispielsweise bei 28 °C, über einen Zeitraum von 2 bis 6 Tagen, beispielsweise 4 Tagen, bei einer Acidität kultiviert, die zu Beginn des Fermentationsprozesses zwischen pH 6,2 und 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, Glyzerin, Mannit, Dextrin, Saccharose, Sojaöl und Sojamehl verwendet werden. Als Stickstoffquellen eignen sich außer den oben erwähnten stickstoffhaltigen Substraten auch Trockenhefe, Fleischpepton und Casein.

Gute Fermentationsergebnisse können bei Zusatz von Mineralsalzen erzielt werden. Letztere begünstigen den Verlauf der Fermentation je nach dem verwendeten Nährmedium. In komplexen Medien, die verschiedene Mehle enthalten, haben sich Zusätze von Kalziumkarbonat, Na-Phosphat bzw. Kalium-Phosphat als vorteilhaft erwiesen. Die Fermentation des Alpharubicin II-Bildners, ZIMET 43 693, kann in Steilbrustflaschen und Rundkolben verschiedenen Inhalts, im Glasfermenter sowie in V2A-Stahltanks durchgeführt werden.

Die Isolierung des Alpharubicin II 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, 3 mal mit salzsaurem Wasser ausgerührt und mit Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt wird. Danach wird erneut mit einem mit Wasser nicht oder nur wenig mischbaren Lösungsmittel reextrahiert, im Vakuum konzentriert, durch Versetzen mit Petroläther unter Rühren ausgefällt, vom Lösungsmittel durch Filtration befreit, mit Petroläther gewaschen und nachfolgend getrocknet. Anschließend wird in niederen Alkoholen gelöst, vom unlöslichen Rückstand filtriert, mit Hilfe säulenchromatographischer Methoden von Beimengungen befreit, mit niederen Alkoholen eluiert, im Vakuum konzentriert, durch wiederholte Säulenchromatographie und Elution mit niederen Alkoholen weiter gereinigt, auf üblichem Wege konzentriert, in mit Wasser nicht oder nur wenig mischbaren Lösungsmitteln aufgenommen, mit Petroläther gefällt, gewaschen und getrocknet. Nachfolgend wird in Wasser aufgenommen, filtriert, lyophilisiert, danach in schwach alkalischem Wasser aufgenommen, mit Chloroform extrahiert, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, vom Unlöslichen filtriert, im Vakuum konzentriert, in organisch-wässrigen Lösungsmittel-Gemischen aufgenommen und mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie von Begleitkomponenten abgetrennt. Die Einzelkomponente wird mit Hilfe üblicher chromatographischer Methoden angereichert und gereinigt. Sie kann gegebenenfalls durch Säurehydrolyse in das Aglykon (α_2 -Rhodomycinon) übergeführt werden.

Alpharubicin II ist eine amorphe, rotbraune Substanz, die sich gut in niederen Alkoholen und mäßig in Chloroform löst. In Wasser, Petroläther und Cyclohexan ist das Anthracyclin-Antibioticum nahezu unlöslich. Das Antibioticum besitzt Indikatoreigenschaften und ist in sauren Lösungen rotgelb, in alkalischen dagegen blauviolett. Alpharubicin II bildet bei der Umsetzung mit der äquivalenten Menge methanolischer Salzsäure in Chloroform/Äther ein kristallines Hydrochlorid mit einem

Ep. 182-185 °C. Das Hydrochlorid ist im Gegensatz zum basischen Antibioticum gut löslich in Wasser, dagegen nahezu unlöslich in Chloroform und Äther. Alharubicin II bildet bei der Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin ein gelbes Pentaacetat $C_{46}H_{58}N_2O_{17}$ (M^+ 910, Massenspektrum). Bei Hydrolyse mit verdünnter Säure in der Wärme liefert das Antibioticum Alharubicin II ein Mol α_2 -Rhodomycinon und 2 Mol Rhodosamin. Durch verschiedene spektroskopische Untersuchungen (UV/VIS-, IR- und NMR-Spektroskopie) sowie durch vergleichende dünn-schichtchromatographische Untersuchungen konnte das Aglykon des Antibioticums Alharubicin II mit dem α_2 -Rhodomycinon (Brockmann und Niemeyer 1968, Chem. Ber., 101, 1341) und die Zuckerkomponente mit Rhodosamin (Brockmann, Spohler und Waehnelt, 1963, Chem. Ber., 96, 2925) identifiziert werden. Auf Grund der chemischen Abbau- und Derivatisierungsreaktionen sowie durch umfassende spektroskopische Untersuchungen (UV/VIS-, IR-, MS-, NMR-Spektroskopie) am intakten Antibioticum gilt es als gesichert, daß es sich bei dem Alharubicin II um ein in der Literatur bisher nicht beschriebenes 7.10-Di-rhodosaminyl- α_2 -rhodomycinon handelt (Abb. 1). Ob Alharubicin II mit dem von Brockmann, Waehnelt und Niemeyer (Tetrahedron Letters 6 (1969), 415) isolierten Glykosid des α_2 -Rhodomycins (als α_2 -Rhodomycin II bezeichnet) identisch ist, kann nicht entschieden werden, da von dem α_2 -Rhodomycinon weder physikalisch-chemische Konstanten bestimmt noch Strukturuntersuchungen durchgeführt wurden.

Sowohl frische Fermentationslösungen des Alharubicin II-Bildners, ZIMET 43 693, als auch das aus ihnen isolierte Alharubicin II besitzen antibiotische Aktivität. Alharubicin II hemmt bevorzugt das Wachstum von grampositiven Bakterien und Mycobakterien. Gegen Vertreter gramnegativer Bakterien, der Hefen oder filamentösen Pilze entfaltet Alharubicin II dagegen keine wachstumshemmende Aktivität.

Bei der Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit des Alharubicin II im Vergleich zur entsprechenden Wirksamkeit der klinisch als Krebschemotherapeutica eingesetzten Anthracyclin-Antibiotica Daunorubicin und Doxorubicin zeigte sich, daß das in Wasser lösliche Alharubicin II-Hydrochlorid unter standardisierten Bedingungen des Agardiffusionstests gegen den

Sporenbildner Bacillus subtilis SG 119 eine geringere Hemmwirkung entfaltet. Im Vergleich zu dem bekannten Iremycin (WP 140 672), das zu den Glykosiden des gamma-Rhodomycons gehört, besitzt Alpharubicin II eine 1,8 fach stärkere antimikrobielle Aktivität gegen den Sporenbildner Bacillus subtilis SG 119. Es bestehen bezüglich der antimikrobiellen Aktivität zwischen dem Alpharubicin I und dem durch dieses Verfahren hergestellten Alpharubicin II wesentliche Unterschiede. Bei einem Vergleich der antimikrobiellen Aktivität zeigt sich, daß Alpharubicin I (Mono-Rhodosaminyl-alpha₂-Rhodomycinon) lediglich 69,8 % der Iremycin-Aktivität erreicht, während Alpharubicin II (Di-Rhodosaminyl-alpha₂-Rhodomycinon) auf Grund eines weiteren Rhodosaminyl-Restes im Molekül 178 % der Iremycin-Aktivität erreicht.

Im Vergleich zu den cytostatisch und cancerostatisch wirksamen Anthracyclin-Antibiotica Daunorubicin und Doxorubicin zeigt Alpharubicin II-Hydrochlorid qualitativ vergleichbare Wirkungen bezüglich der Wechselwirkung mit der DNA in vitro und dem DNA-Stoffwechsel in der Zelle, die für die cytostatische Wirkung der Anthracyclin-Antibiotica in Mikroorganismen und Säugerzellen sowie für die Antitumorwirksamkeit im Tierversuch verantwortlich gemacht werden. Alpharubicin II unterdrückt zudem in selektiver Weise die Vermehrung von DNA-Viren in gramnegativen 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.

Alpharubicin II kann also 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 ermöglicht.

Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispiele dienen dazu, die Erfindung zu erläutern, ohne sie hierauf zu beschränken.

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 Alpharubicin II-Bildners ZIMET 43 693 beimpft, welche mit steriler, isotoni-scher Kochsalzlösung von einer im Reagenzglas auf folgendem Anzucht-Nährboden gezüchteten, 10 bis 14 Tage alten Kultur des Alpharubicin II-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.

Mit einer Kultur des Alpharubicin II-Bildners von einem festen Nährboden wie bereits beschrieben, beimpft man 80 ml des 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 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.

400 l auf diese Weise gewonnene Kulturlösung werden mit Salzsäure auf pH 5,0 eingestellt und nach Separieren des Mycels werden 360 l Kulturfiltrat und 40 kg Mycel erhalten. Durch 3maliges Ausrühren des Mycels mit Methanol bzw. HCl-saurem Methanol wird ein Methanol-Extrakt gewonnen, der mit NaOH neutralisiert und nachfolgend auf üblichem Wege konzentriert wird. Das erhaltene Mycelextraktkonzentrat wird mit Wasser aufgenommen und mit Butanol reextrahiert, der gewonnene Butanol-extrakt wird danach im Vakuum konzentriert und mit dem aus dem Kulturfiltrat gewonnenen Butanolextraktkonzentrat vereinigt. Das Kulturfiltrat wird mit Butanol im Verhältnis 3:1 extrahiert und nach dem üblichen Konzentrieren des Extrakts werden die aus Mycel und Kulturfiltrat erhaltenen und vereinigten Butanolextraktkonzentrate (je 10 l) 3mal mit HCl-saurem Wasser bei pH 5,5 ausgerührt, die wässrige Phase wird danach mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit Butanol erschöpfend reextrahiert und konzentriert, so daß nach Zufügen des 3fachen Volumens an Petroläther 80 g Rohprodukt ausgefällt, filtriert, mit Petroläther gewaschen und getrocknet erhalten werden können.

80 g dieses Rohproduktes werden in Methanol gelöst, vom Unlöslichen wird abfiltriert und das Filtrat wird auf eine Sephadex LH-20-Säule aufgetragen, mit Methanol eluiert und in die biologisch aktiven Eluate I und II sowie in das biologisch inaktive Aglykon-Eluat getrennt. Mit dem Eluat II wird nach Konzentrieren im Vakuum eine 2. Feintrennung auf einer LH-20-Säule angeschlossen, das vom Eluat I und den Aglykonen befreite Eluat II wird konzentriert, mit Butanol aufgenommen, von Methanol durch Destillieren befreit, mit Petroläther gefällt, abgesaugt, mit Petroläther gewaschen und getrocknet. Anschließend wird das Petrolätherfällungsprodukt des Eluats II in Wasser gelöst, mittels einer G5-Fritte filtriert und nachfolgend als II-Fraktion lyophilisiert. Es werden auf diese Weise 26 g der II-Fraktion erhalten.

Davon werden 5 g in schwach alkalischem Wasser (NaHCO_3 -Lösung) aufgenommen und mit Chloroform extrahiert, unter Zusatz von Na_2SO_4 getrocknet und filtriert und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Es werden 4,2 g II-Base erhalten. Letztere wird im Elutionsmittel (Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser = 80:18:7:3) gelöst, vom Unlöslichen abfiltriert. Das Filtrat wird auf eine HPLC-Säule aufgetragen, deren Säulenlänge 800 mm, Durchmesser 50 mm beträgt. Als Trägermaterial dient Kieselgel H (Merck) und der Druck beträgt 7 bis 8 atü (durch Druckgas erzeugt).

50 Eluate zu je 50 ml werden mit Wasser ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit NH_4OH neutralisiert und mit Chloroform reextrahiert. Nach Trocknen des Chloroform-Extrakts über Na_2SO_4 und nach Filtrieren werden alle erhaltenen Fraktionen dünnschichtchromatographisch überprüft, die Alpharubicin II enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeengt.

Die Ausbeute an rohem Alpharubicin II beträgt 260 mg.

Eine Feinreinigung des Alpharubicin II erfolgt nach Lösen in Methanol und Auftragen der Lösung auf 1 mm-Kieselgel-Dünnschichtplatten und Entwicklung in o.g. Elutionsmittel. Die entstandene Zone auf der DC-Platte wird abgeschabt, aus dem Kieselgel mit Methanol extrahiert und nach Zusatz von mindestens dem fünffachen Volumen einer 5%igen NaHCO_3 -Lösung wird filtriert und der erhaltene wässrig-alkoholische Extrakt mit Chloroform reextrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet, erneut fil-

triert und zur Trockne eingeengt.

Zur Feinstreinigung wird die Reinigungsoperation wiederholt.

Die Ausbeute beträgt 32 mg Alpharubicin II.

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 6,3.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Alpharubicin II sowie seines Aglykons, gekennzeichnet dadurch, daß die Mutante ZIMET 43 693 der Art Streptomyces violaceus 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 Alpharubicin II sowohl aus dem Mycel als auch aus dem Kulturfiltrat bei einer Acidität zwischen pH 3,0 und pH 9,0 mittels üblicher Lösungsmittel extrahiert, nachfolgend mit üblichen Methoden konzentriert, ausgefällt und unter Anwendung der Hochleistungs-Chromatografie gereinigt und als Base gewonnen oder in Salze bzw. gegebenenfalls durch Säurehydrolyse in sein Aglykon (α_2 -Rhodomycinon) übergeführt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Kultivierung bei 28 °C über einen Zeitraum von 4 Tagen durchgeführt wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

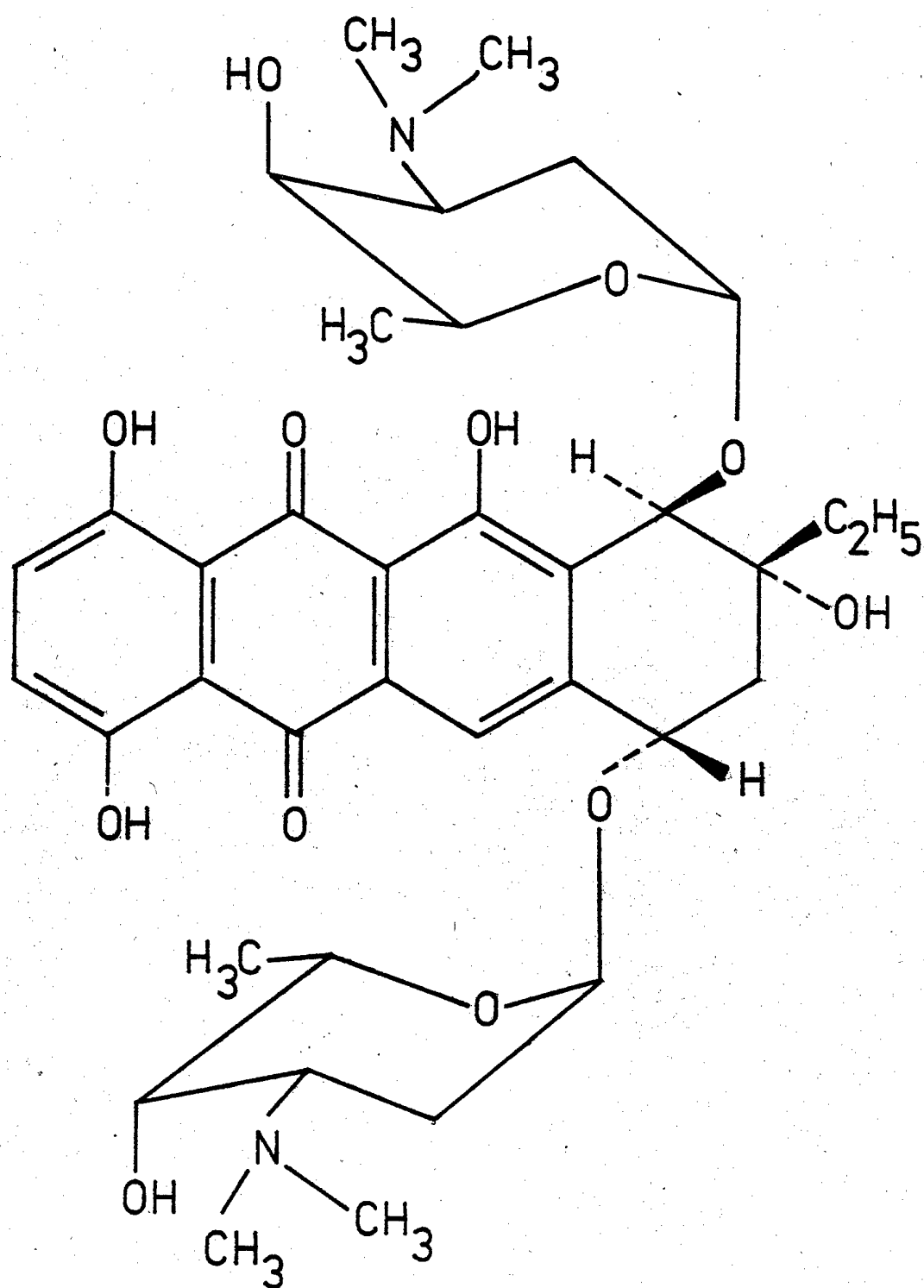


Abb. 1