



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2004 040 014 B4 2007.12.13

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2004 040 014.8

(22) Anmeldetag: 16.08.2004

(43) Offenlegungstag: 16.03.2006

(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 13.12.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07D 407/04** (2006.01)

**C12P 17/16** (2006.01)

**A61K 31/351** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A01N 43/16** (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

**Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,  
07745 Jena, DE**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwaltskanzlei Bock Bieber  
Donath Partnerschaftsgesellschaft, 07745 Jena**

(72) Erfinder:

**Dahse, Hans-Martin, Dr., 99423 Weimar, DE; He,  
Jing, 07745 Jena, DE; Hertweck, Christian, Dr.,  
04105 Leipzig, DE; Ziehl, Martina, 07745 Jena, DE**

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

**DE 41 21 468 A1**

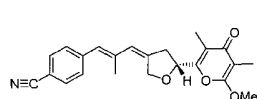
**US 52 50 566 A**

**Pat. Abstr. of Jp., 11292763 A;**

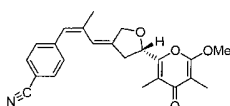
**dto. 9194366 A;**

(54) Bezeichnung: **Aureonitrile, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung**

(57) Hauptanspruch: Verbindung der Formel I und/oder der  
Formel II:



**HKI 10429005 - A  
Aureonitril (E,Z)**



**HKI 10429005 - B  
Aureonitril (Z,Z)**

im Gemisch oder als Reinsubstanzen.

Synonyme: Aureonitril,  
2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-[tetrahydro-4-(β-methyl-p-cyanocinnanylidene)]-4H-pyran-4-un

Aussehen: dunkelgelbe Kristalle

Schmelzpunkt: nicht angebar (zu geringe Substanzmenge)

spezifische Drehung:

$[\alpha]_D^{25} = -67,22^\circ$  (in MeOH)

MS:

$m/z$  (%): ESI+ (M+H)<sup>+</sup> (16), (M+Na)<sup>+</sup> (11), (2M+Na)<sup>+</sup> (100); ESI- /  
C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ber.: 378,1700; gef.: 378,1705

E,Z-Isomer:

<sup>1</sup>H-NMR:

1,83 (s, 3H, 17a-CH<sub>3</sub>); 2,0 (s, 3H, 9a-CH<sub>3</sub>); 2,0 (s, 3H, 15a-CH<sub>3</sub>); 2,98 (m, 2H, 13-CH<sub>2</sub>); 3,92 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>);  
4,71 / 4,83 (br d, H<sub>A</sub>-H<sub>B</sub>, AB, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 14,15 Hz, 11a-CH<sub>2</sub>); 5,11 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,98 / 6,89 Hz, 12-CH); 6,16 (s,  
1H, 10-CH); 6,3 (t, 1H, 8-CH); 7,31 (d, 2H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8,19 Hz, arom. Protonen 3+5); 7,6 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,29 Hz,  
aromat. Protonen 2+6)

<sup>13</sup>C-NMR:

6,89 (17a-CH<sub>3</sub>); 9,42 (15a-CH<sub>3</sub>); 17,64 (9a-CH<sub>3</sub>); 38,26 (13-CH<sub>2</sub>); 55,26 (O-CH<sub>3</sub>); 70,09 (11a-  
CH<sub>2</sub>); 73,33 (12-CH); 100,11 (17-C); 110,1 (1-C); 118,89 (4-C); 120,18 (15-C); 128,0 (10-  
CH); 128,71 (8-CH); 129,53 (aromat. C-Atome 3+5); 132,0 (aromat. C-Atome 2+6); 137,89  
(9-C); 140,22 (11-C); 142,14 (CN); 154,72 (14-C); 162,09 (18-C); 180,59 (16-C)

IR:

3080-3040, w (ν<sub>C-H</sub>, Aromat); 3040-3010, w (ν<sub>C-H</sub>, Alkenylgruppe); 2957, m / 2924, m / 2855,  
m (ν<sub>C-H</sub>, s (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>)); 2223, m (ν<sub>C≡N</sub>); 1718, w (ν<sub>C=O</sub>, Ringketone > 6); 1662, s (ν<sub>C=O</sub>, konj.  
Ketone); 1591, s / 1499, w (ν<sub>C=O</sub>, Aromat); 1462-1376, m (δ<sub>CH</sub>, s (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>)); 1255, m / 1162, s /  
1051, m / 915, w (ν<sub>C-O-C</sub>)

**Beschreibung**

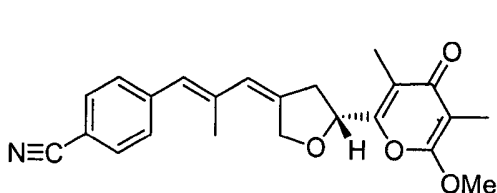
**[0001]** Die Erfindung betrifft Aureonitrile, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung.

**[0002]** Polyketidantibiotika und der Polyketidstoffwechsel sind seit vielen Jahren bekannt (D. O'Hagan, The Polyketide Metabolites, Ellis Horwood, Chichester, 1991).

**[0003]** Auch ist bekannt, dass *Streptomyces thioluteus* das Polyketidantibiotikum Aureothin synthetisiert (Y. Hirata, H. Nakata, K. Yamada, K. Okuhara, T. Naito, Tetrahedron, 1961, 14, 252) und dass verschiedene andere *Streptomyces*-Stämme in der Lage sind, Derivate dieser Verbindung zu synthetisieren.

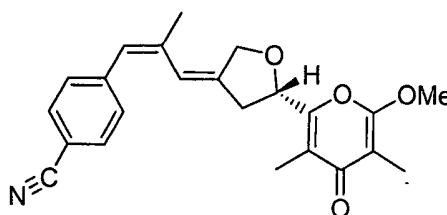
**[0004]** Aufgabe der Erfindung ist es, neue Aureothin-Derivate mit guter zytostatischer Wirkung bereitzustellen, sowie deren Herstellung und Verwendung anzugeben.

**[0005]** Diese Aufgabe wird durch die Aureothin-Derivate folgender Strukturen (Formel I und II) gelöst:



**HKI 10429005 - A**  
**Aureonitril (E,Z)**

**Formel I**



**HKI 10429005 - B**  
**Aureonitril (Z,Z)**

**Formel II**

**[0006]** Ausgangspunkt für die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Aureothin-Derivate (Formel I und II) ist die Fermentation eines *Streptomyces thioluteus*-Stammes, bspw. des Wildstammes *Streptomyces thioluteus* DSM 40027, in einem flüssigen Nährmedium mit Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, üblichen anorganischen Salzen und zuzugebenden Präkursoren, bis sich die neuen Aureothin-Derivate mit guter zytostatischer Wirkung, auch als HKI 10429005 bezeichnet, in der Kultur anhäuft und anschließend HKI 10429005 in reiner Form daraus isoliert werden kann.

**[0007]** An Stelle der *Streptomyces thioluteus*-Stämme können auch deren Varianten und Mutanten eingesetzt werden. Als Varianten und Mutanten gelten alle jenen Mikroorganismen der Spezies, die in der Lage sind, die erfindungsgemäßen Verbindungen zu synthetisieren. Solche Varianten und Mutanten können in an sich bekannter Weise durch physikalische Mittel, bspw. Bestrahlung mit UV- oder Röntgenstrahlen, chemischer Mutagenen oder durch gezielte Konstruktion und Transformation von Plasmiden, bspw. in *Streptomyces lividans*, erzeugt werden.

**[0008]** Das Screening nach Varianten und Mutanten, die die beiden erfindungsgemäßen Verbindungen synthetisieren, kann durch Bestimmung der biologischen Aktivität des Kulturüberstandes, insbesondere der Zytotoxizität, anhand der dem Fachmann bekannten Methoden durchgeführt werden.

**[0009]** HKI 10429005 sind zwei Aureothin-Derivate (Formel I und II), die sich von den bisher bekannten Aureothin-Derivaten durch ihre chemischen Strukturen, deren Neuheit durch physikochemische Messungen zweifelsfrei belegt wird (Fig. 1), unterscheiden.

**[0010]** Obwohl aus den *Streptomyces thioluteus*-Stämmen schon andere Aureothin-Derivate bekannt sind, wurden jetzt die beiden neuen Aureothin-Derivate HKI 10429005 entdeckt, die überraschenderweise eine sehr starke zytostatische Wirksamkeit besitzen (Fig. 2 und Fig. 3).

**[0011]** HKI 10429005 kann somit u.a. als Zytostatikum eingesetzt werden.

**[0012]** Darüber hinaus besitzt HKI 10429005 auch antifungale und antibakterielle Wirksamkeit (Fig. 3).

**[0013]** Die im folgenden beschriebenen Fermentationsbedingungen gelten für *Streptomyces thioluteus* und den hinterlegten Stamm *Streptomyces thioluteus* DSM 40027 sowie für Varianten und Mutanten und transfor-

mierte *Streptomyces lividans*-Spezies.

**[0014]** Als bevorzugte Kohlenstoffquellen für die aerobe Fermentation eignen sich Na-Pyruvat und Na-Propionat, assimilierbare Kohlenhydrate und Zuckeralkohole, wie Glucose, Lactose, Maltose, Glycerol und D-Mannitol, oder deren Gemische sowie kohlenhydrathaltige Naturprodukte, wie Malzextrakt oder Melasse.

**[0015]** Als Stickstoffquellen eignen sich Ammoniumsalze, Nitrate, Aminosäuren, Peptide und Proteine sowie deren Abbauprodukte, wie Tryptone und Peptone, Hefe- und Fleischextrakte, gemahlene Samen sowie Rückstände der Alkoholherstellung.

**[0016]** An organischen Salzen kann die Nährlösung zum Beispiel Phosphate, Sulfate, Chloride oder Carbonate der Alkali- und Erdalkalimetalle, Mangan, Eisen und Kobalt enthalten.

**[0017]** Als Präkursoren werden para-Cyano-substituierte aromatische Verbindungen, wie bspw. para-Cyanobenzoat, eingesetzt. Alternativ dazu können auch höhermolekulare Verbindungen, aus denen die Streptomycesspezies in der Lage sind, para-Cyano-substituierte aromatische Verbindungen zu gewinnen, eingesetzt werden.

**[0018]** Die Kultivierung erfolgt aerob, zum Beispiel submers unter Schütteln oder Rühren in Schüttelkolben oder Fermentern, gegebenenfalls unter Zuführung von Luft oder Sauerstoff.

**[0019]** Die Fermentation kann bei einer Temperatur von 15 bis 37°C, vorzugsweise bei 20 bis 35°C, insbesondere bei 26 bis 31°C durchgeführt werden. Der pH-Bereich sollte zwischen 4,0 und 8,0 liegen, vorteilhaft zwischen 6,5, und 7,5.

**[0020]** Man kultiviert die *Streptomyces*-Stämme unter diesen Bedingungen im allgemeinen über einen Zeitraum von 2 bis 10 Tagen, bevorzugt 3 bis 6 Tage.

**[0021]** Vorteilhaft kultiviert man in aufeinanderfolgenden Stufen, in dem man eine oder mehrere aufeinanderfolgende Vorkulturen mit flüssigem Nährmedium kultiviert und dann in das eigentliche Produktionsmedium (Hauptkultur) überimpft.

**[0022]** Die Präkursoren werden bspw. jeweils am 1., 2. und 3. Tag zugesetzt, wobei sechs Tage nach der ersten Präkursor-Zugabe die Fermenterlösung mit Salzsäure neutralisiert wird.

**[0023]** Das Volumenverhältnis von Vor- und Hauptkultur beträgt beispielsweise 1:10. Das Mycel für die Vorkultur kann zum Beispiel erhalten werden, in dem man aus der Stammhaltung Biomasse steril separiert.

**[0024]** Der Fermentationsverlauf kann anhand der Biomassezunahme, der Kohlenstoffquellenabnahme und der Kontrolle der Produktbildung, bspw. Enzyme, durch chromatographische Methoden, wie zum Beispiel durch Dünnschicht- oder Hochdruckflüssigchromatographie, bzw. Tests der enzymatischen oder biologischen Aktivitäten überwacht werden.

**[0025]** Besonders vorteilhaft wird für die Fermentation eine M10 Nährlösung folgender Zusammensetzung verwendet:

4g Hefeextrakt

10g Malzextrakt

4g Glucose

gelöst in 1 Liter H<sub>2</sub>O

mit eingestelltem pH-Wert von 7,3.

**[0026]** Die beimpften Bakterienkulturen, je 100 ml Nährlösung in 500 ml-Erlenmeyerkolben, werden bei 28°C mit 200 rpm für 5 Tage auf einem Schüttler bewegt, wobei der Nährlösung am 1. Tag mit 0,012 mmol Präkursor (bspw. para-Cyanobenzoat), am 2. Tag mit 0,006 mmol Präkursor und am 3. Tag mit 0,003 mmol zugesetzt wird.

**[0027]** Nach 6 Tagen wird die Fermentationsflüssigkeit (der Kulturüberstand) geerntet, und aus diesem wird mit bekannten Methoden der Essigsäureextraktion ein Rohextrakt gewonnen.

**[0028]** Dieser Rohextrakt wird bis zur Trockenheit eingeeengt und anschließend in Methanol aufgenommen,

um bekannten chromatographischen Methoden (bspw. Kieselgelsäulenchromatographie: NP  $\text{CHCl}_3$ -Gradient:  $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 9:1; Gelchromatographie: Sephadex LH-20, MeOH, präparative HPLC: RP, AcCn:  $\text{H}_2\text{O}$ ) zugeführt zu werden.

**[0029]** Durch sequentielle Anwendung der Säulenchromatographie unter Verwendung von polaren organischen Lösungsmitteln wird schließlich reines HKI 10429005 erhalten.

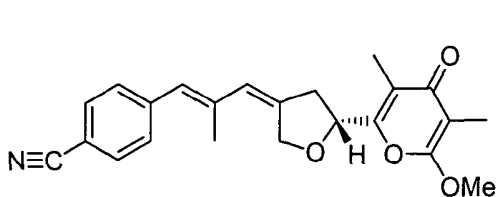
**[0030]** Die chemische Identität des Wirkstoffs HKI 10429005 wird durch die Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektroskopie (FAB-MS, Quadrupol-Electrospray-MS; CID-MS/MS) sowie durch hochauflösende H- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Korrelations-Spektroskopie bewiesen.

**[0031]** Die beiden erfindungsgemäßen Aureothin-Derivate HKI 10429005 (Formel I und II) eignen sich einzeln sowie in Mischung aufgrund ihrer sehr wertvollen zytostatischen und antifungalen Wirkung sehr gut zur Anwendung als Therapeutikum, insbesondere bei der Bekämpfung von schnell wachsenden eukaryontischen Zellen und von verschiedenen Pilzerkrankungen.

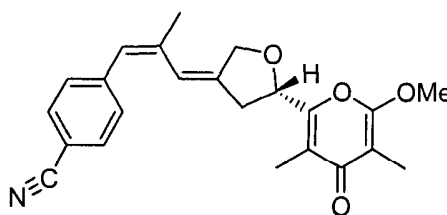
**[0032]** Die beiden erfindungsgemäßen Aureothin-Derivate HKI 10429005 (Formel I und II) können als solche einzeln, in Mischung oder als pharmazeutische Zubereitung mit geeigneten, dem Fachmann bekannten Hilfsstoffen oder Trägermaterialien verabreicht werden (Tabletten, Kapseln, Dragees, Salben, Sprays, TTS oder Gele).

### Patentansprüche

1. Verbindung der Formel I und/oder der Formel II:



**HKI 10429005 - A**  
**Aureonitril (E,Z)**



**HKI 10429005 - B**  
**Aureonitril (Z,Z)**

im Gemisch oder als Reinsubstanzen.

2. Verfahren zur Herstellung des Gemisches oder einer Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man *Streptomyces thioluteus* in einem Nährmedium, welchem ein Präkursor zugesetzt wird, kultiviert, bis sich eine Verbindung der Formel I und/oder II in dieser ansammelt und aus dieser isoliert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass *Streptomyces thioluteus* DSM 40027 kultiviert wird.

4. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Präkursoren para-Cyanosubstituierte aromatische Verbindungen sind.

5. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die para-Cyano-substituierte aromatische Verbindung para-Cyanobenzoat ist.

6. Verwendung einer Verbindung der Formel I und/oder II nach Anspruch 1 als Zytostatikum.

7. Verwendung einer Verbindung der Formel I und/oder II nach Anspruch 1 als Fungizid.

8. Verwendung einer Verbindung der Formel I und/oder II nach Anspruch 1 als Antibiotikum.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

**Synonyme:** Aureonitril,

2-Methoxy-3,5-dimethyl-6-[tetrahydro-4-( $\beta$ -methyl-p-cyancinnamyliden)]-4H-pyran-4-on

**Aussehen:** dunkelgelbe Kristalle

**Schmelzpunkt:** nicht angebbbar (zu geringe Substanzmenge)

**spezifische Drehung:**

$[\alpha]_D = -67,22^\circ$  (in MeOH)

**MS:**

$m/z$  (%): ESI+ (M+H)<sup>+</sup> (16), (M+Na)<sup>+</sup> (11), (2M+Na)<sup>+</sup> (100); ESI- /

C23.H24.N.O4 ber.: 378,1700; gef.: 378,1705

*E,Z-Isomer:*

**<sup>1</sup>H-NMR:**

1,83 (s, 3H, 17a-CH<sub>3</sub>); 2,0 (s, 3H, 9a-CH<sub>3</sub>); 2,0 (s, 3H, 15a-CH<sub>3</sub>); 2,98 (m, 2H, 13-CH<sub>2</sub>); 3,92 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>); 4,71 / 4,83 (br d, H<sub>A</sub>+H<sub>B</sub>, AB, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 14,15 Hz, 11a-CH<sub>2</sub>); 5,11 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6,98 / 6,89 Hz, 12-CH); 6,16 (s, 1H, 10-CH); 6,3 (s, 1H, 8-CH); 7,31 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,19 Hz, aromat. Protonen 3+5); 7,6 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,29 Hz, aromat. Protonen 2+6)

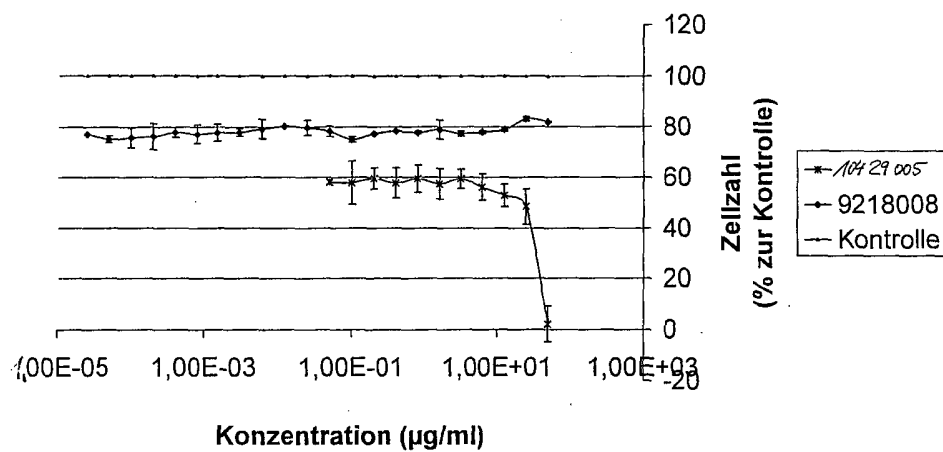
**<sup>13</sup>C-NMR:**

6,89 (17a-CH<sub>3</sub>); 9,42 (15a-CH<sub>3</sub>); 17,64 (9a-CH<sub>3</sub>); 38,26 (13-CH<sub>2</sub>); 55,26 (O-CH<sub>3</sub>); 70,09 (11a-CH<sub>2</sub>); 73,33 (12-CH); 100,11 (17-C); 110,1 (1-C); 118,89 (4-C); 120,18 (15-C); 126,0 (10-CH); 128,71 (8-CH); 129,53 (aromat. C-Atome 3+5); 132,0 (aromat. C-Atome 2+6); 137,89 (9-C); 140,22 (11-C); 142,14 (CN); 154,72 (14-C); 162,09 (18-C); 180,59 (16-C)

**IR:**

3080-3040, w ( $\nu_{C-H}$ , Aromat); 3040-3010, w ( $\nu_{C-H}$ , Alkenylgruppe); 2957, m / 2924, m / 2855, m ( $\nu_{as, s}$  (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>)); 2223, m ( $\nu_{C\equiv N}$ ); 1718, w ( $\nu_{C=O}$ , Ringketone  $\geq 6$ ); 1662, s ( $\nu_{C=O}$ , konj. Ketone); 1591, s / 1499, w ( $\nu_{C=C}$ , Aromat); 1462-1376, m ( $\delta_{as, s}$  (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>)); 1255, m / 1162, s / 1051, m / 915, w ( $\nu_{C-O-C}$ )

**Fig. 1**



Zytotoxizität von Aureonitril an HeLa: Dosis-Wirkungs-Kurve

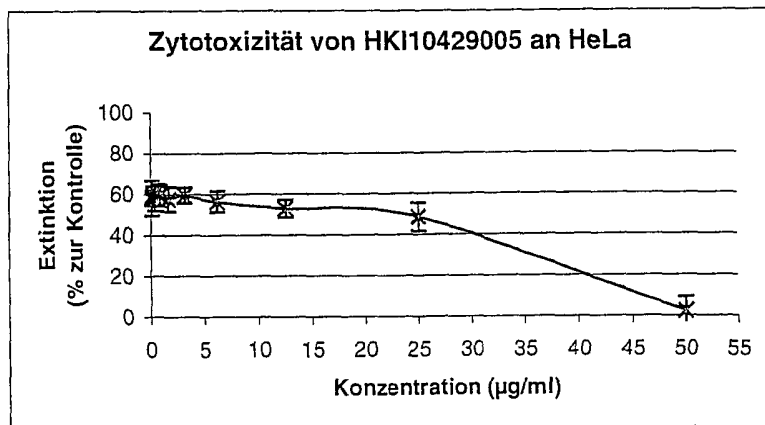


Fig. 2

Ergebnisse der Testung der antiproliferativen Aktivität sowie Zytotoxizität von Aureonitril

Zellart	Konzentration [µg/ ml]	Kategorie
L 929 K 562	10,2	GI <sub>50</sub> 1 / 2
	3,5	2
HeLa	35,4	CC <sub>50</sub> 1

Ergebnisse der Enzymtests und des pharmakologischen Tests

Substanz	Kategorie			
	PMNL	Xanthin-Oxidase	3α-HSD	Peroxidase
I	1	0	1	0
II	0	0	1	0

(GI<sub>50</sub> = 50 % antiproliferative Konzentration, CC<sub>50</sub> = 50 % zytotoxische Konzentration)

**Fig. 3**

Ergebnisse der Testung der antimikrobiellen Aktivität (p = partiell, P = stark partiell, F = fördernd)

Mikroorganismus	I <sup>1)</sup>	II <sup>1)</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11 Ek / 0	0 / 0
<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	10 / 0	0 / 0
<i>Escherichia coli</i> SG 458	9 / 0	0 / 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 137	48 p / 27 p	36p / >30 p
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Zellwand-Defekt) K799 / 61	0 / 0	0 / 0
<i>Staphylococcus aureus</i> mr 134 / 93	14 p / 0	0 / 0
<i>Enterococcus faecalis</i> / Glycopeptid-r 1528	13 p, 21 F / 0	0 / 0
<i>Mycobacterium vaccae</i> IMET 10670	14 p / 0	0 / 0
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> SBUG 549	41 P / 39 P	39 P / 38 P
<i>Candida albicans</i> BMSY 212	34 p / 33 p	33 p / 32 p
<i>Penicillium notatum</i> JP 36	44, 48 p / 34, 44 p	34, 42 p / 36, 40 p

<sup>1)</sup> Hemmhofdurchmesser [mm] (1000 µg/ ml / 100 µg/ ml)

**Fig. 4**