(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2022 120 408 A1** 2024.02.15

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2022 120 408.1**
(22) Anmeldetag: **12.08.2022**
(43) Offenlegungstag: **15.02.2024**

(51) Int Cl.: ***C07K 5/037*** (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(71) Anmelder:
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Körperschaft des öffentlichen Rechts, 07743 Jena, DE; Universität Bremen, Körperschaft des öffentlichen Rechts, 28359 Bremen, DE

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwaltskanzlei Bock Bieber Donath Partnerschaftsgesellschaft, 07743 Jena, DE

(72) Erfinder:
Greßler, Markus, Dr., 07745 Jena, DE; Rassbach, Johannes, 07907 Schleiz, DE; Merseburger, Peter, Gent, BE; Rohlfs, Marko, Prof. Dr., 28359 Bremen, DE; Binnemann, Niko, 28359 Bremen, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:

BALDEWEG, Florian, et al. Fungal biosurfactants from Mortierella alpina. Organic let-ters, 2019, 21. Jg., Nr. 5, S. 1444-1448.

SONNABEND, Robin; SEILER, Lucas; GRESSLER, Markus. Regulation of the Leu-cine Metabolism in Mortierella alpina. Journal of Fungi, 2022, 8. Jg., Nr. 2, S. 196.

WURLITZER, Jacob M., et al. Bacterial-like nonribosomal peptide synthetases pro-duce cyclopeptides in the zygomycetous fungus Mortierella alpina. Applied and En-vironmental Microbiology, 2021, 87. Jg., Nr. 3, S. e02051-20.

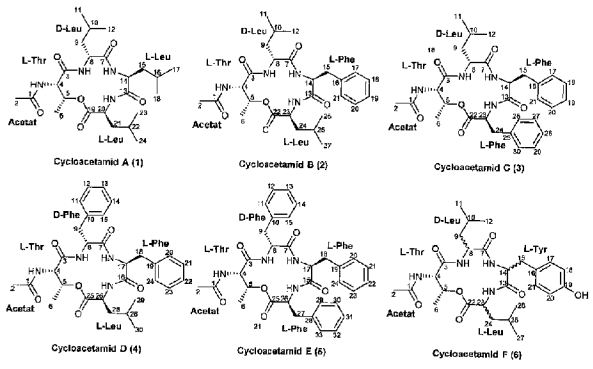
Rechercheantrag gemäß § 43 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Cycloacetamid, neuer Naturstoff aus Mortierella alpina, Verfahren zu seiner Herstellung, seine Verwendung sowie Mortierella alpina DSM 34346**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft den Naturstoff Cycloacetamide A bis F als neuer Matabolit aus Mortierella alpina, ein Verfahren zu seiner Herstellung, seine Verwendung sowie den Stamm Mortierella alpina DSM 34346.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen neue Naturstoff (Biowirkstoff) aus einer bisher kaum erforschten Gruppe von basalevolutionären Pilzen, wie Mortierella spec., durch Isolation und Identifizierung anzugeben, der eine neue pharmazeutische Leitstruktur darstellt, ein biologisches Verfahren zu seiner wirtschaftlichen und zeitsparenden Herstellung mit hoher Produktausbeute und ohne besonderen apparativen Aufwand und alternativ ein chemisches Syntheseverfahren zu seiner Herstellung bereitzustellen und seine Verwendung (Bioaktivität) darzulegen, wird dadurch gelöst, dass Cycloacetamide A bis F bereit gestellt werden, welche der allgemeinen Formel cyclo-(-N-Ac-L-Thr-A-B-C-O-) entsprechen, wobei L-Thr L-konfiguriertes Threonin darstellt und, in welcher A, B und C unabhängig voneinander gleiche oder verschiedene L- oder D-konfigurierten Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten darstellen, insbesondere Alanin (Ala), Valin (Val), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) oder Tryptophan (Trp), wobei der Pilz Mortierella alpina in Nährmedium kultiviert wird und dabei Cycloacetamide A bis F entsteht was aus dem Nährmedium extrahiert und als aufkonzentriertes Extrakt durch präparative und seminprärparative HPLC in Reinsubstanzen von Cycloacetamide A bis F getrennt wird, wobei Cycloacetamide A bis F als Insektizid wirkt und der Produzentenstamm Mortierella alpina DSM 34346 ist, bzw. ein chemischer Syntheseweg als Alternative der biologischen Produktion von Cycloacetamide A bis F aufgezeigt wird, wobei die Cycloacetamide A bis F als Insektizid verwendbar sind.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft den Naturstoff Cycloacetamid, insbesondere die Cycloacetamide A bis F, welcher als Naturstoff durch den Pilz Mortierella alpina während der Fermentation synthetisiert und in den Kulturüberstand bzw. das Mycel abgegeben wird, ein Herstellungsverfahren sowie die biologische Wirksamkeit der Cycloacetamide A bis F und den Produzentenstamm / Pilzstamm Mortierella alpina DSM 34346.

[0002] In der Naturstoffforschung wie auch der Pharmazie werden neue Wirkstoffe traditionell aus Bakterien oder höheren Pilzen (Asco- oder Basidiomyceten) isoliert. Häufig kommt es dabei aber immer wieder zur Re-Identifikation von gleichen Substanzen oder Substanzklassen. Es ist daher zielführend neue Wirkstoffproduzenten zu suchen, die bisher nicht im Fokus der Naturstoffforschung lagen.

[0003] Naturstoffe werden bereits seit hunderten von Jahren aus Mikroorganismen isoliert und bilden den Grundstock für mehr als ein Drittel aller auf dem Markt erhältlichen Antibiotika, Immunsuppressiva und Zytostatika.

[0004] Naturstoffe sind niedermolekulare chemische Verbindungen, die dem Sekundärstoffwechsel entstammen, und werden von Pflanzen aber auch von Mikroorganismen gebildet. Hierbei sind die wichtigsten pharmazeutischen Produzenten Bakterien sowie höhere Pilze der Abteilung der Ascomyceten und Basidiomyceten.

[0005] Basale Pilze, d.h. evolutionär früh entwickelte Pilze, wie bspw. Mortierella alpina, waren bisher nicht im Fokus der pharmazeutischen Wirkstoffforschung, weil sie dem Dogma unterlagen, keine Naturstoffe produzieren zu können.

[0006] Basale Pilze - bis 2016 im Paraphylum „Zygomyceten“ zusammengefasst - sind erst seit wenigen Jahren in den Fokus der Naturstoffchemiker gekommen, da einige Vertreter entgegen dem bisherigen Dogma in der Lage sind, Sekundärmetabolite zu bilden. Der Vertreter Mortierella alpina gehört in das Subphylum der Mortierellomycotina und wird als GRAS-Organismus (Generally Recognized As Safe; „allgemein anerkannt als sicher“) bereits in der Nahrungsmittel- und Futtermittel-Industrie zur Herstellung von Ölen mit vielfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäuren und γ-Linolensäure großtechnisch fermentiert.

[0007] Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass Mortierella alpina auch peptidische Naturstoffe produziert, nämlich die Biotenside Malpinin A-D (Hexapeptide), die antimycobakterielle Substanz Calpinactam (Hexapeptid) und die Antibiotika Malpicycline A-D (Cyclopentapeptide) (Baldeweg F, Warncke P, Fischer D, Gressler M. Fungal Biosurfactants from Mortierella alpina. Org Lett. 2019 Mar 1;21(5):1444-1448. doi: 10.1021/acs.orglett.9b00193. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30789272; Wurlitzer JM, Stanišić A, Wasmuth I, Jungmann S, Fischer D, Kries H, Gressler M. Bacterial-Like Nonribosomal Peptide Synthetases Produce Cyclopeptides in the Zygomycetous Fungus Mortierella alpina. Appl Environ Microbiol. 2021 Jan 15;87(3): e02051-20. doi: 10.1128/AEM.02051-20. PMID: 33158886; PMCID: PMC7848919; Koyama N, Kojima S, Nonaka K, Masuma R, Matsumoto M, Omura S, Tomoda H. Calpinactam, a new anti-mycobacterial agent, produced by Mortierella alpina FKI-4905. J Antibiot (Tokyo). 2010 Apr;63(4):183-6. doi: 10.1038/ja.2010.14. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20186169.).

[0008] Daneben produziert der Pilz Mortierella alpina auch Malpibaldine A-C, hydrophobe Cyclopentapeptide mit unbekannter Funktion (Baldeweg F, Warncke P, Fischer D, Gressler M. Fungal Biosurfactants from Mortierella alpina. Org Lett. 2019 Mar 1;21 (5): 1444-1448. doi: 10.1021/acs.orglett.9b00193. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30789272).

[0009] Mortierella alpina kommt ubiquitär vor und kann aus dem Erdboden vornehmlich aus den gemäßigten, subpolaren und polaren Zonen isoliert werden.

[0010] Vor wenigen Jahren wurden Mortierella-Spezies aus der Antarktis isoliert, die eine insektizide Wirkung auf die Puppen der Gemeinen Stubenfliege sowie auf Larven der Wachsmotte besitzen, wenngleich auch der Grund für dieses Phänomen nicht beschrieben wurde (Edgington S, Thompson E, Moore D, Hughes KA, Bridge P. Investigating the insecticidal potential of Geomyces (Myxotrichaceae: Helotiales) and Mortierella (Mortierellacea: Mortierellales) isolated from Antarctica. Springerplus. 2014 Jun 9,3:289. doi: 10.1186/2193-1801-3-289. PMID: 25013747; PMCID: PMC4071458.).

[0011] In den Stammsammlungen der Jena Microbial Resource Collection (JMRC) sind eine Vielzahl an Mortierella alpina -Isolaten hinterlegt und als solche bereits 2013 genetisch re-identifiziert worden (Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, Papp T, Vágvölgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K. A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. Persoonia. 2013; 30:77-93. doi: 10.3767/003158513X666268. PMID: 24027348; PMCID: PMC3734968).

[0012] Insektizide sind Pestizide, die eine Wachstumshemmung und eine Abtötung von adulten Insekten oder ihren Entwicklungsstadien (Ei, Larve, Puppe) induzieren. Momentan sind sehr viele Insektizide auf dem Markt, die oftmals energieaufwendig durch mehrstufige Synthese hergestellt und deren toxische (halogenierte oder sulfurierte) Nebenprodukte dann kostenintensiv entsorgt werden müssen. Da es sich bei Insekten auch um Eukaryonten handelt, sind die gängigen Insektizide oft auch toxisch für höhere Organismen (Tiere und den Menschen). Entsprechend der Vorgabe durch das Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), einem Zusammenschluss namhafter insektizidproduzierender Unternehmen (https://irac-online.org/), werden Insektizide nach ihrem Wirktarget und chemischer Struktur in 26 Klassen eingeteilt.

[0013] Die meisten der 26 synthetischen Verbindungen wirken unspezifisch (d.h. art-übergreifend) und enthalten Halogene (Fluor, Chlor) oder Schwefel, was die Umweltverträglichkeit mindert und die Toxizität für den Menschen erhöht.

[0014] Eine Alternative stellen daher Proteine oder Peptide dar, die in den o.g. Substanzklassen vollkommen unterrepräsentiert sind.

[0015] Proteine wie die o.g. Bacillus thuringensis-Toxine werden in der Agrarindustrie als Fraßschutzmittel bereits eingesetzt, sind aber chemisch weniger stabil, da sie durch Proteasen hydrolytisch abgebaut werden können (Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins (Basel). 2014 Dec 11;6(12):3296-325. doi: 10.3390/toxins6123296. PMID: 25514092; PMCID: PMC4280536.).

[0016] Bisher wurden nur wenige, wenngleich auch pharmazeutisch / agrarwirtschaftlich bedeutsame Insektizide aus Mikroorganismen, Pflanzen oder Würmern gewonnen. Dazu zählen die Avermectine (Makrolide aus Streptomyces avermitilis), Milbemycine (Makrolide aus Streptomyces hygroscopicus), Spinosyne (cyclisches Polyketide aus dem Bakterium Saccharopolyspora spinosa), Nereistoxin (niederes Organodisulfid aus dem Anneliden Lumbriconereis heteropoda) und die o.g. Bacillus thuringensis-Toxine (kleine ribosomal gebildete Proteine).

[0017] Cyclische Oligopeptide mit insektizider Wirkung sind sehr selten. Das nicht-ribosomal gebildete Cyclodepsioctapeptid Bassianolid aus Beauveria bassiana zeigt neben insektizider Wirkung auch eine Inhibition der acetylcholin-induzierten glatten Muskulatur sowie antiplasmodiale und antimycobacterielle Aktivitäten.

[0018] Bassianolid wirkt daher eher unspezifisch (Xu Y, Orozco R, Kithsiri Wijeratne EM, Espinosa-Artiles P, Leslie Gunatilaka AA, Patricia Stock S, Molnar I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of Beauveria bassiana. Fungal Genet Biol. 2009 May;46(5):353-64. doi: 10.1016/j.fgb.2009.03.001. Epub 2009 Mar 11. PMID: 19285149).

[0019] Die nahe verwandte Verbindung PF1022A, isoliert aus Mycelia sterila, wirkt anthelminthisch, aber nicht insektizid (Harder A, Schmitt-Wrede HP, Krücken J, Marinovski P, Wunderlich F, Willson J, Amliwala K, Holden-Dye L, Walker R. Cyclooctadepsipeptides–an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. Int J Antimicrob Agents. 2003 Sep;22(3):318-31. doi: 10.1016/s0924-8579(03)00219-x. PMID: 13678839.).

[0020] Die cyclischen Hexadepsipeptide Beauvericin aus Beauveria bassiana und Enniatine aus Fusarium spec. sind insektizid und zeigen ebenso eine sehr breite biologische Aktivität (Xu Y, Zhan J, Wijeratne EM, Bums AM, Gunatilaka AA, Molnár I. Cytotoxic and Antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen Beauveria bassiana ATCC 7159. J Nat Prod. 2007 Sep;70 (9):1467-71. doi: 10.1021/np070262f. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17803266 und Firäkovä S, Proksa B, Sturdikova M. Biosynthesis and biological activity of enniatins. Pharmazie. 2007 Aug;62(8):563-8. PMID: 17867547).

[0021] Die am besten untersuchten Cyclopeptide sind die Destruxine A-F aus Metarhizium anisopliae/ Oospora destructor (Dornetshuber-Fleiss R, Heffeter P, Mohr T, Hazemi P, Kryeziu K, Seger C, Berger W,

Lemmens-Gruber R. Destruxins: fungal-derived cyclohexadepsipeptides with multifaceted anticancer and antiangiogenic activities. Biochem Pharmacol. 2013 Aug 1;86(3):361-77. doi: 10.1016/j.bcp.2013.05.022. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23747344; PMCID: PMC5850990).

[0022] Sie wirken insektizid auf den Seidenspinner (Bombyx mori), den Gemeinen Rosenkäfer (Cetonia aurata), den Mexikanischen Bohnenkäfer (Epilachna sparsa), die Große Wachsmotte (Galleria mellonella), den Baumwollkapselbohrer (Heliothis virescens), die Gemeine Stubenfliege (Musca domestica), den Asiatischen Nashornkäfer (Oryctes rhinoceros), den Senfkäfer (Phaedon cochleariae) und die Kohlschabe (Plutella xylostella), zeigen aber auch breite phytotoxische Effekte auf Brassica spec., Camelina sativa, Capsella bursa-pastoris, Capsicum annuum, Chenopodium quinoa, Citrullus lanatus, Diplotaxis erucoides, Eruca sativa, Hirschfeldia incana, Hordeum vulgare, Lycopersicon esculentum, Nicotiana spec., Phaseolus vulgaris, Raphanus sativus, Sinapis spec., Sisymbrium officinalis, Solanum tuberosum, Thlaspi arvense, Triticum aestivum usw. (Pedras MS, Irina Zaharia L, Ward DE. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. Phytochemistry. 2002 Mar;59(6):579-96. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00016-x. PMID: 11867090.).

[0023] Als Fazit zum dem zuvor stehend aufgeführten vorbekannten Stand der Technik lässt sich festhalten, dass bisher keine selektiv insektizid wirkenden Cyclopeptide entdeckt wurden.

[0024] Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, einen neue Naturstoff (Biowirkstoff) aus einer bisher kaum erforschten Gruppe von basalevolutionären Pilzen wie Mortierella spec. durch Isolation und Identifizierung anzugeben, der eine neue pharmazeutische Leitstruktur darstellt, ein biologisches Verfahren zu seiner wirtschaftlichen und zeitsparenden Herstellung mit hoher Produktausbeute und ohne besonderen apparativen Aufwand und alternativ ein chemisches Syntheseverfahren zu seiner Herstellung bereitzustellen sowie seine Verwendung (Bioaktivität) darzulegen.

[0025] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des 1. Patentanspruchs gelöst. Weitere günstige Ausgestaltungsmöglichkeiten der Erfindung sind in den nachgeordneten Patentansprüchen angegeben.

[0026] Diese Aufgabe wird gelöst, indem mehrere Mortierella spec.-Isolate in Kulturmedium angezogen und deren Extrakte chromatografisch analysiert wurden.

[0027] Bevorzugt wurden die zwei Mortierella alpina- Stämme JMRC:SF:10519 und JMRC:SF:10520 aus der JMRC kultiviert, um so die Produktion, Isolation und Wirkstoffanalyse des neuen Naturstoffs zu ermöglichen.

[0028] Es war so möglich aus den Stämmen JMRC:SF:10519 und JMRC:SF:10520 sechs neuartige Substanzen, Cylcoacetamide A-F, zu identifizieren, von denen die zwei Vertreter Cycloacetamid A und B isoliert, strukturaufgeklärt und in einem Screening-Verfahren auf Bioaktivität getestet wurden. Cycloacetamide A-F haben eine insektizide Wirkung gegen Fruchtfliegenlarven.

[0029] Besonders bevorzugt wird der Mortierella alpina- Stamm DSM 34346 kultiviert, um so die Produktion, Isolation und Wirkstoffanalyse (Strukturaufklärung) des neuen Naturstoffs in Form des strukturaufgeklärten Cycloacetamide A und B zu ermöglichen.

[0030] Cycloacetamide A und B haben insektizide Aktivität gegenüber Fliegenlarven, zeigen aber kaum Bioaktivität gegenüber anderen Organismen.

[0031] Cycloacetamide gehören in die Gruppe der Cyclodepsitetrapeptide. Cyclodepsitetrapeptide zeichnen sich durch eine kanonische peptidischverknüpfte Kette an Aminosäuren aus, die durch eine Esterbindung zu einem Ring geschlossen sind. Für diesen Ringschluss werden nucleophile Aminosäuren benötigt, die eine freie Hydroxyl- oder Thiolgruppe tragen (wie Threonin, Serin und Cystein).

[0032] Es sind bisher viele Cyclodepsitetrapeptide aus Bakterien bekannt, die diverse biologische Funktionen besitzen. Hierzu zählen das Antibiotikum Xenamid A aus Xenorhabdus nematophila, das Antibiotikum Teixobactin aus Eleftheria terrae sowie die Cyclodepsit Fatflabet A und Xeneprotid A mit unbekannter biologischer Funktion (aus Xenorhabdus und Photorhabdus spec. isoliert). Die verzweigende Aminosäure in den Cycloacteamiden ist L-Threonin, an deren N-Terminus eine Acetylgruppe amidiert ist. Neben den oben genannten Cyclopeptiden, gibt es zahlreiche bioaktive, Threonin-verzweigende Cyclopenta- bis -decapeptide

aus Bakterien - unter ihnen das Antiprozoikum Taxlllaid A aus Xenorhabdus indica, das Antibiotikum Tumescenamid C aus Streptomyces spec. und das kommerziell verwendete Antibiotikum Daptomycin aus Streptomyces roseo.

[0033] Cyclische Peptide aus Pilzen sind eher selten: Hierzu zählen das immunmodulierende Aspergillicin F aus Aspergillus flavus sowie das cytotoxische Zygosporamid aus Zygosporium masonii.

[0034] Mit dem vorliegenden Verfahren wird eine neuartige Familie von sechs peptidischen Wirkstoffen, die Cycloacetamide, aus dem basalevolutionären Pilz Mortierella alpina- Stamm JMRC:SF:10519 und JMRC: SF: 10520, wobei als Produzentenstamm JMRC:SF:10519 als DSM 34346 hinterlegt ist, isoliert, charakterisiert und auf biologische Aktivität/Wirksamkeit getestet.

[0035] Die Wirkstoffe / Naturstoffe Cycloacetamide A bis F werden kontinuierlich, unabhängig von dem verwendeten Kulturmedium gebildet, was eine nachhaltige Produktion auch auf organischen Industrieabfällen als Kohlenstoffquelle ermöglicht. Die Substanzen lassen sich sowohl im Mycel des Pilzes als auch aus dem Kulturfiltrat isolieren, wobei letzteres die Substanzen in größerer Reinheit enthält. Cycloacetamide A bis F, insbesondere A und B, zeichnet sich durch eine selektiv insektizide Wirkung aus.

[0036] Bei dem Verfahren zur Herstellung von Cycloacetamide A und B durch den Mucoromyceten Mortierella alpina, wird das Pilzmyzel in für Pilzkulturen bekannter Weise auf einer Agaroberfläche gezüchtet und homogenisiert (mechanisch zerkleinert), das homogenisierte Pilzmyzel wird in eine Nährlösung für eine Vorkultur überführt, die Vorkultur wird bebrütet oder geschüttelt und, falls erforderlich, erneut zerkleinert. Zur Produktion des Naturstoffes Cycloacetamide, insbesondere Cycloacetamide A und B, wird die Vorkultur in ein Produktionsgefäß überführt und einer weiteren Nährlösung ausgesetzt. Das Gemisch der Naturstoffe Cycloacetamide A bis F wird im Produktionsgefäß geerntet oder nach Abzug dieser von der Nährlösung getrennt.

[0037] Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass mit dem Mucoromyceten Mortierella alpina ohne die Notwendigkeit der Fixierung an einen Träger an sich bekannten Produktionsgefäßen, wie Rührkesselreaktor, Fermenter etc., der neue Naturstoff Cycloacetamide A und der neue Naturstoff Cycloacetamide B (im Gemisch A-F) gewonnen werden kann, ohne die Scherkraftbelastung während der Naturstoffbildung in der Nährlösung zu reduzieren. Dies bedeutet, dass der Pilz Mortierella alpina keine besonderen Anforderungen an die Erzeugung der Vorkultur sowie an die Form und Funktion des Produktionsgefäßes gestellt werden. Während bei bekannten technischen Lösungen zur Fermentation von Pilzen teilweise sehr spezielle und aufwendige Strukturen für die Lagerung, Behandlung und Umwälzung erforderlich sind, um schädliche Auswirkungen von Scherkräften auf das naturstoffbildende Myzel zu vermeiden oder zumindest zu reduzieren, werden bei der erfindungsgemäßen Produktionslösung Produktionsgefäße verwendet, ohne dass deren Größe, Form und Funktion die Konsistenz der Nährlösung und die Bildung des Naturstoffs Cycloacetamide A bis F negativ beeinflussen. Auf diese Weise wird ein großer Durchsatz und eine effektivere Bildung des Naturstoffs Cycloacetamide A bis F ermöglicht. Als besonders vorteilhaft hat sich zum einen die Verwendung von herkömmlichen Pilzmedien und zum anderen die Durchführung von zyklischen oder kontinuierlichen Naturstoffgewinnungsprozessen erwiesen. Dies ermöglicht die Gewinnung von Naturstoff in herkömmlichen Produktionsgefäßen, wobei die Produktausbeute und die Zeiteffektivität sehr gut sind.

[0038] Die Abtrennung / Isolation von Cycloacetamide A und Cycloacetamide B aus dem Gemisch A bis F erfolgt nach Flüssig-Flüssig-Extraktion, Abtrennung der organischen Phase der Extraktion, Eindampfen und Lyophilisation des aufkonzentrierten Extraktes mit an sich bekannten Methoden der Chromatographie, in Form der präparativen HPLC und der semipräparativen HPLC. Das Schema zur Abtrennung / Isolation der einzelnen Cycloacetamide A und B aus dem Gemisch A bis F ist schematisch in **Abb.** 8 dargestellt.

[0039] In einer Anwendung des Verfahrens wurde der Pilzstamm Mortierella alpina (DSM 34346) in einem einfachen Rührkesselreaktor in einem Nährlösungsvolumen von 30 Litern kultiviert. Die Kultivierungsdauer betrug 5-8 Tage. Überraschenderweise konnten ein- bis zu 30-fach höhere Kulturvolumina eingesetzt werden, um das Gemisch der Naturstoffe Cycloacetamide A bis F durch Fermentation herzustellen, was allerdings auf den Einsatz von Scheibenrührern mit relativ hohen Scherkräften zurückzuführen ist. In einem weiteren Verfahren wurde die Raum-ZeitAusbeute durch den gezielten Austausch des Produktionsmediums noch deutlich erhöht.

[0040] Durch den bis zu zehnfachen Medienwechsel kann die Pilzkultur von Mortierella alpina (DSM 34346) auch überraschenderweise für mehrere Wochen in produktivem Zustand gehalten werden und so kann mit

einer Kultur bis zum Zehnfachen des üblichen Fermentorvolumens ein aktives naturstoffhaltiges Kulturfiltrat gewonnen werden, wobei der Naturstoff auch im Myzel nachweisbar ist.

[0041] Die Erfindung wird nachstehend an Hand der schematischen **Abb.** 1 bis 8 und der Tabellen 1 bis 4 und den Ausführungsbeispiel näher erläutert, ohne auf dieses beschränkt zu werden.

[0042] Es zeigen dabei

Abb. 1: die Strukturformeln der erfindungsgemäßen Cycloacetamid-Derivate A bis F,

Abb. 2: das ESI-MS/MS-Spektrum des erfindungsgemäßen Cycloacetamid-Derivates A gemäß **Abb.** 1 (Fragmentierung mit einer Kollisionsdissoziationsenergie von 20%),

Abb. 3: das ESI-MS/MS-Spektrum des erfindungsgemäßen Cycloacetamid-Derivates B gemäß **Abb.** 1 (Fragmentierung mit einer Kollisionsdissoziationsenergie von 20%),

Abb. 4: des ESI-MS/MS- Spektrum des erfindungsgemäßen Cycloacetamid-Derivates C gemäß **Abb.** 1 (Fragmentierung mit einer Kollisionsdissoziationsenergie von 20%),

Abb. 5: ESI-MS/MS-Spektrum des erfindungsgemäßen Cycloacetamid-Derivates D gemäß **Abb.** 1 (Fragmentierung mit einer Kollisionsdissoziationsenergie von 20%),

Abb. 6: das ESI-MS/MS-Spektrum des erfindungsgemäßen Cycloacetamid-Derivates E gemäß **Abb.** 1 (Fragmentierung mit einer Kollisionsdissoziationsenergie von 20%),

Abb. 7: das ESI-MS/MS-Spektrum des erfindungsgemäßen Cycloacetamid-Derivates F gemäß **Abb.** 1 (Fragmentierung mit einer Kollisionsdissoziationsenergie von 20%),

Abb. 8: ein Schema zur Isolation von Cycloacetamid-Derivaten A bis E aus Kulturen von Mortierella alpina,

Abb. 9: ein Schema zur chemischen Darstellung von Cycloacetamiden,

Abb. 10: ein ITS-Sequenz-Vergleich zwischen dem Mortierella alpina Referenzstamm ATCC32222 und den beiden Cycloacetamid-produzierenden Mortierella alpina-Stämmen JMRC:SF:10519 und JMRC: SF10520

Abb. 11: die konzentrationsabhängige Induktion der Mortalität von Larven der Schwarzbäuchigen Fruchtfliege (Drosophila melanogaster) durch Cycloacetamid A (linkes Säulendiagramm) sowie Cycloacetamid B (rechtes Säulendiagramm) sowie

Tabelle 1: die physikochemischen Parameter der Cycloacetamid-Derivate A bis F gemäß **Abb.** 1,

Tabelle 2: die NMR-Daten von 1 (in DMSO-d_6), wobei * überlappende Signale, ** Signale nur detektierbar in DEPT-NMR-Spektren, chemische Verschiebung (δ) in ppm, Muliplizität (s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, m Multiplett), Kopplungskonstanten (J) in Hz,

Tabelle 3: die NMR-Daten von 2 (in DMSO-d_6), wobei * überlappende Signale, ** Signale nur detektierbar in DEPT-NMR-Spektren, chemische Verschiebung (δ) in ppm, Muliplizität (s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, m Multiplett), Kopplungskonstanten (J) in Hz,

Tabelle 4: die NMR-Daten von 2 (in CD_3OD), wobei * überlappende Signale. ** Signale nur detektierbar in DEPT-NMR-Spektren, chemische Verschiebung (δ) in ppm, Muliplizität (s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, m Multiplett), Kopplungskonstanten (J) in Hz,

Tabelle 5: Übersicht über die semipräparativen HPLC-Methoden zur Isolation der Cycloacetamid-Derivaten A bis E aus Kulturen von Mortierella alpina gemäß **Abb.** 8 und

Tabelle 6: Daten der Bestimmung der biologischen Aktivitäten der Cycloacetamide A und B mit a) Agardiffusionstest gegen Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus (MRSA, VRSA), Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa; b) MIC-Bestimmung gegen Mycobacterium smegmatis; c) Agardiffusionstest gegen Streptomyces prunicolor, Streptomyces canus, Streptomyces fradiae; d) Agardiffusionstest gegen Sporidiobolus salmonicolor, Candida albicans, Penicillium notatum, e) Zytotoxizität gegen HeLa, U-937, HUVEC, K-562; f) pro/antiinflammatorische Freisetzung von Prostaglandinen durch Monocyt-abstammenden M2-Makrophagen; g) ATPbasierter Luciferase-Viabilitätsassay mit Trypanosoma brucei, h) Caenorhabditis elegans. n.b., nicht bestimmt.

[0043] Die Strukturformeln der sechs neu bereitgestellten Substanzen Cylcoacetamide A bis F sind in der **Abb.** 1 dargestellt.

[0044] Bei den beschriebenen Strukturen (siehe **Abb.** 1) handelt es sich um Strukturisomere von Cyclodepsitetrapeptiden mit N-terminal acetylierten Threonin (Position 1). Während alle anderen Aminosäuren die kanonische L-Konfiguration aufweisen, ist ausschließlich die Aminosäure an Position 2 D-konfiguriert (D-Leu bei 1-3 und D-Phe bei 4 und 5). An Position 3 befindet sich entweder L-Leu (in 1), L-Phe (in 2, 3, 4 und 5) oder L-Tyr (in 6). An Position 4 befindet sich L-Leu (in 1, 2, 4 und 6) oder L-Phe (in 3 und 5). Die Konfigurationen der Stereozentren in 6 wurden nicht bestimmt.

[0045] Die Summenformeln, die Doppelbindungsäquivalente (DBE) und die exakte Masse der Cylcoacetamide A bis F (=Verbindungen 1-6) sind in Tabelle 1 dargestellt.

[0046] Die Strukturaufklärung erfolgte mittels HPLC-MS/MS (siehe dazu **Abb.** 2 bis 7) und die Konfiguration der Aminosäuren wurde mittels Marfey's Analyse bestimmt.

[0047] Für die Cylcoacetamide A und B (=Verbindung 1 und 2) wurde die Struktur durch 1D- und 2D-NMR-Analysen in deuteriertem Dimethylsulfoxid und Methanol bestätigt (siehe dazu Tabellen 2-4).

[0048] Die Cylcoacetamide A und B (=Verbindung 1 und 2) sind protease-stabil und lassen sich beispielsweise nicht durch Chymotrypsin abbauen.

[0049] Alle Cylcoacetamide A bis F (=Verbindungen 1-6) sind bis zu ihrer Bereitstellung unbekannt, da sie bisher in keiner chemischen Datenbank (SciFinder, Reaxys, Dictionary of Natural Products by Chapman and Hall) hinterlegt sind.

Ausführungsbeispiel 1

- Vorkulturen (2.000 ml Erlenmeyerkolben mit je 500 ml Medium)-

[0050] Mortierella alpina (DSM 34346) wird als Stamm verwendet. Der produzierende Organismus Mortierella alpina (DSM 34346) wird auf MEP-Agarplatten (30 g/L Malzextrakt, 3 g/L Soja-Pepton, 18 g/L Agar, pH 5.6) bei 25°C für 7 Tage kultiviert und anschließend für 1-2 Wochen im Kühlschrank (4-7°C) aufbewahrt, um die Lipidsynthese und Sporulation anzuregen. Die Platten können so bis zu 2 Monate gelagert werden.

[0051] Mit je 3-6 bewachsenen MEP-Agarblöcken von der Mortierella alpina-Kultur-Agarplatte (DSM 34346) werden 2.000 ml Erlenmeyerkolben mit je 500 ml Medium beimpft und anschließend bei 25°C und 130 rpm für mindestens 10 Tage inkubiert werden.

[0052] Die Ausbeuten an Cycloacetamid B (Verbindung 2) in MEP betragen nach 7 Tagen etwa 0,5-0,7 mg pro g Biotrockenmasse bzw. nach 10 Tagen etwa 1,2-1,3 mg pro g Biotrockenmasse. Eine wesentliche Produktsteigerung ist nach 10 Tagen nicht zu erwarten.

[0053] Für die Metabolitproduktion kommen diverse komplexe Flüssigmedien wie MEP (30 g/L Malzextrakt, 3 g/L Soja-Pepton pH 5.6) oder YPD (20 g/L Soja-Pepton, 20 g/L Glucose, 10 g/L Hefeextrakt, pH 6-7) in Frage. Die Ausbeute ist in MEP-Medium in der Regel um Faktor 2 höher. Prinzipiell können aber auch diverse andere Vollmedien (inklusive organische Küchen- oder Industrieabfälle) verwendet werden, da die Produktion unabhängig vom Medium erfolgt. Lediglich das Wachstum auf anorganischen Nitrat- oder Ammoniumsalzen als alleinige Stickstoffquelle sollte vermieden werden, da diese die Wachstumsrate enorm verringern.

[0054] Um die Produktion von spezifischen Cycloacetamiden anzuregen, empfiehlt sich nach dem Autoklavieren der Medien (121°C, 20 min) der Zusatz der einzubauenden Aminosäuren (10 mM L-Leucin für Verbindung 1, 10 mM L-Phenylalanin für Verbindung 2 - 5 und 5 mM L-Tyrosin für Verbindung 6).

[0055] Die Kultivierung erfolgt zwingend aerob (emers oder submers unter Schütteln in Kolben oder alternativ auch in einem Fermenter mit Sauerstoff- oder Luftzufuhr).

[0056] Da es sich bei dem Produzenten um einen psychrotoleranten Organismus handelt, kann die Kultivierung zwischen 4°C und 30°C erfolgen. Höhere Temperaturen sollten vermieden werden.

[0057] Tolerierte pH-Bereiche liegen zwischen pH 5 und pH 9, ideal bei pH 6 - pH 7.

[0058] Kultiverungszeiten schwanken je nach Kulturmedium zwischen 3 und 21 Tagen. In MEP sind 10 Tage ideal.

[0059] Cylcoacetamide A bis F (=Verbindungen 1-6) sind sowohl im Kulturfiltrat als auch im Mycel enthalten und die Isolation der erfindungsgemäßen Verbindung erfolgt nach bekannten Methoden entsprechend bekannter physikalisch-chemischer Trennverfahren und der biologischen Aktivität der Wirkstoffe (siehe Schema in **Abb.** 8).

[0060] Der Kultivierungserfolg kann anhand der Biomasse-Zunahme oder besser anhand von extrahierten Kulturfiltrat-Aliquoten und deren nachfolgende chromatographische Analyse verfolgt werden.

Ausführungsbeispiel 2

-Maßstabvergrößerung ein 5 Liter- Fermenter-

[0061] Die Vorkulturen (2.000 ml Erlenmeyerkolben mit je 500 ml Medium) von Mortierella alpina (DSM 34346) werden wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

[0062] Mit drei dieser Vorkulturen von Mortierella alpina (DSM 34346) als Produktionsstamm wird zur Maßstabvergrößerung ein 5 Liter- Fermenter mit Scheibenrührer beimpft (Kulturdauer 10 Tage, 25°C und 130 rpm).

[0063] Die Kultivierungsbedingungen entsprechen denen gemäß Ausführungsbeispiel 1.

[0064] Nach Erreichen der Kultivierungsdauer von 10 Tagen im 5 Liter-Fermenter werden Rühren und Belüftung abgeschaltet (ca. 30 Min.).

[0065] Nach dieser Zeit hat sich die Pilzbiomasse am Boden des Fermenters abgesetzt. Der Überstand des naturstoffhaltigen Kulturmediums wird in geeigneter Weise abgetrennt und das Myzel bleibt im 5 Liter- Fermenter zurück. Neues, steriles Medium wird aufgefüllt. Nach 10 Tagen wird die Kultur erneut geerntet. Auf diese Weise wird das Verfahren fortgesetzt (so lange wie nötig). Pro Zyklus können maximal 4,5 1 naturstoffhaltige Kulturlösung gewonnen werden.

[0066] Die Ausbeuten an Cycloacetamid B (Verbindung 2) entsprechen den Ausbeuten gemäß Ausführungsbeispiel 1. Eine wesentliche Produktsteigerung ist auch hier nach 10 Tagen nicht mehr zu erwarten.

[0067] Die Cycloacetamide A bis E (= Verbindungen 1-6) sind sowohl im Kulturfiltrat als auch im Mycel enthalten und die Isolation der erfindungsgemäßen Verbindung erfolgt nach bekannten Methoden entsprechend bekannter physikalisch-chemischen Trennverfahren und der biologischen Aktivität der Wirkstoffe (siehe Schema in **Abb.** 8).

Ausführungsbeispiel 3

-Isolation der Cycloacetamide A bis E aus dem MEP-Kulturmedium-

[0068] Das Mortierella alpina (DSM 34346)- Mycel wird durch Zentrifugation oder Filtration beispielsweise über Miracloth entfernt.

[0069] Das Kulturfiltrat (13-15 Liter) wird mit 3 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und dreimal mit dem gleichen Volumen eines wasserunlöslichen Lösungsmittels (vorzugsweise Ethylacetat, Chloroform oder Dichlormethan) extrahiert.

[0070] Das Lösungsmittel wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers und Lyophilisation entfernt.

[0071] Der Cycloacetamid-enthaltene Rückstand wird in 150 ml Methanol aufgenommen.

[0072] Der Rohextrakt wird für 15 min bei 5.000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, und anschließend weiter über eine semipräparative HPLC aufgereinigt.

[0073] Das Cycloacetamide A und das Cycloacetamide B (=Verbindung 1 und 2) werden mit der HPLC-Methode 1 und nachfolgend der Methode 2 isoliert (siehe Tabelle 5).

[0074] Die Cycloacetamide C bis E (= Verbindungen 3 - 5) werden mit HPLC-Methode 3 vorgereinigt (siehe Tabelle 5).

[0075] Die reine Verbindung 5 wird von 3 und 4 mittels HPLC-Methode 4 abgetrennt. Die enantioselektive Separation von 3 und 4 wird mit HPLC-Methode 5 erreicht (siehe Tabelle 5).

[0076] Da die Substanzen kaum UV-absorbierend sind, sollte die Analytik mittels Massenspektrometrie erfolgen.

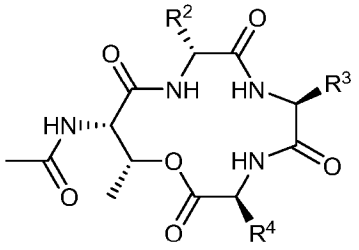
Ausführungsbeispiel 4

Verfahren zur chemischen Synthese der Cycloacetamide A-F (Verbindungen 1-6)

[0077] Mit dem erfindungsgemäßen chemischen Syntheseverfahren sind die Cycloacetamide A bis F (Verbindungen 1-6) mit der allgemeinen Formel

cyclo-(-N-Ac-$_L$-Thr-A-B-C-O-)

herstellbar, wobei $_L$-Thr $_L$-konfiguriertes Threonin darstellt und in welcher A, B und C unabhängig voneinander gleiche oder verschiedene $_L$- oder $_D$-konfigurierte Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten darstellen, insbesondere Alanin (Ala), Valin (Val), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) oder Tryptophan (Trp).

cyclo-(-*N*-Ac-L-Thr-A-B-C-O-) mit Aminosäure A mit Rest R^2 Aminosäure B mit Rest R^3 Aminosäure C mit Rest R^4	 **7**

[0078] Die Verbindungen der Formel

cyclo-(-N-Ac-$_L$-Thr-A-B-C-O-)

sind jeweils eine Sequenz von Aminosäuren, welche durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind und einen N- sowie einen C-Terminus besitzen. Die in Klammern beschriebene Aminosäuresequenz ist dabei durch einen intramolekularen Ester über die Hydroxygruppe des N-acetylierten Threonins mit der C-terminalen Carboxygruppe der Aminosäure C cyclisiert. Bei der Formel

cyclo-(-N-Ac-L-Thr-A-B-C-O-)

handelt es sich um Cyclotetradepsipeptide, die nach in der Peptidchemie bekannten Methoden in Lösung synthetisiert werden können wie sie beispielsweise in der Literatur in Standardwerken (Houben Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart) oder Übersichtsarbeiten (wie Y. Okada, Synthesis of Peptides by Solution Methods, Current Organic Chemistry) zu finden sind.

[0079] Wichtige grundsätzliche Teilschritte der Synthese sind dabei die

a) lineare Kopplung der jeweils geeignet geschützten AminosäureDerivate

b) lineare Veresterung der mit einer Aminoschutzgruppe X protektierten Aminosäure C mit N-Ac-L-Thr -O, wobei Y eine Alkylhydroxyschutzgruppe darstellt

c) Abspaltung der Amino- bzw. Carboxylschutzgruppen der jeweils erhaltenen Peptide

d) Makrolaktamisierung des finalen linearen Depsipeptids.

[0080] Als Aminoschutzgruppe X sind Schutzgruppen geeignet, die die vorhandene Aminogruppe vor chemischen Reaktionen schützen sollen, und nach Belieben durch saure oder alkalische Hydrolyse, Reduktion oder nukleophilen Angriff wieder abgespalten werden kann. Dazu zählen vor allem Urethanderivate wie z.B. die tert-Butyloxycarbonyl (Boc)-Gruppe. Die Blockade der Carboxylfunktion der Aminosäuren erfolgt als Alkylester Y, z.B. als Methylester, welche wiederum durch alkalische oder nukleophile Dealkylierung entschützt wird. Dies entspricht der allgemeinen Peptidschutzgruppenchemie wie beispielsweise in Kocienski, Protecting Groups, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart nachzulesen ist.

[0081] Das besondere dieser technischen Lösung besteht darin, dass die nichtkanonische Flüssigphasensynthese eines Cyclotetradepsipeptides unter Zuhilfenahme einer Kombination von standard- sowie nicht standardmäßig verwendeten Entschützungsstrategien erfolgt, um die Integrität des intramolekularen Esters des Peptids zu gewährleisten. Insbesondere die Kombination aus i) der selten verwendete Deprotektion des Methylesters mit Trimethylzinnhydroxid (K. Nicolaou et al., A mild and selective method for the hydrolysis of esters with trimethyltin hydroxide. Angewandte Chemie 44, 1378-1382 und H. A. Grab, Total Synthesis of the Cyclic Depsipeptide Vioprolide D via its (Z)-Diastereoisomer. Angewandte Chemie - International Edition 59, 12357-12361), ii) der Entschützung der Boc-Gruppe durch Trimethylsilyliodid (M. Jung und M. Lyster, Conversion of Alkyl Carbamates into Amines via Treatment with Trimethylsilyl Iodide, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications) und iii) der finalen Makrolaktamisierung statt -laktonisierung stellen dabei ein Novum dar.

[0082] Als Synthesestrategie dient daher die Herstellung des kompletten linearen Depsipeptids mit anschließender finaler Makrolaktamisierung, so wie in der **Abb.** 9 als Übersichtsschema dargestellt.

[0083] Die dafür notwendige Veresterung erfolgt nach dem Vorbild von Steglich (B. Neises und W. Steglich, Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, Angewandte Chemie 17, 522-524), jedoch mit Einsatz des Kupplungsreagenzes EDC-HCl (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid) anstelle des DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) (M. Tsakos et al., Ester coupling reactions-an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products, Natural Product Reports 32, 605-632).

[0084] Die in **Abb.** 9 als Übersichtsschema aufgeführten Beispiele verweisen exemplarisch auf die Syntheseschritte von cyclo-(N-Ac-L-Thr-L-Leu-L-Phe-D-Leu-O-) (Verbindung 2) und sollen im Folgenden der Erläuterung der Erfindung dienen.

Beispiel 1 in Abbildung 9:

[0085] Zur Verknüpfung einer neuen Peptidbindung wird die entschützte Säure (z.B. N-Boc-D-Leu-COOH) in Dichlormethan (DCM) gelöst, sodass eine 0.2 M-Lösung entsteht. Diese wird mit 4 Äquivalenten DIPEA (N,N-Diisopropylethylamin) und 1.1 Äquivalenten TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,1,3,3-tetramethylaminiumtetrafluoroborat) für fünf Minuten inkubiert. Für das Generieren des Tetrapeptids kann DIPEA weggelassen werden, um den intramolekularen Ester zu erhalten. Anschließend wird eine Lösung der zu koppelnden Aminosäure (z.B. NH_2-L-Phe-OMe-HCl) bzw. des zu koppelnden Peptides in DCM dazugegeben, um eine Endkonzentration von 0.1 M der jeweiligen Substrate zu erhalten. Die Reaktion wird nach 3.5 - 22 h durch Waschen des Ansatzes mit dreimal 10 - 15 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung und einmal mit 10 - 15 mL Wasser beendet. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit 50 mL Dichlormethan gegenextrahiert und alle erhaltenen organischen Phasen vereinigt und unter vermindertem Druck eingeengt. Die Dipeptide werden per Flash-Chromatographie über eine FP Si 12 g-Säule bei 30 L/min Flussrate und DCM als Eluent A sowie Methanol als Eluent B aufgereinigt. Das synthetisierte Dipeptid NH_2-D-Leu-L-Phe-OMe wird in 5 mL DCM resuspendiert und auf die genannte Säule injiziert und ein Gradient von 0 - 6.4 min: 0 % B, 6.4 - 9.5 min: 20 % B, 9.5 - 12.1 min: 40 % B, 12.1 - 19.6 min: 100 % B verwendet.

[0086] Die erhaltenen linearen Tetrapeptide werden mittels Flash-Chromatographie über eine FP Si- Säule mit Hexan als Eluent A und Ethylacetat als Eluent B aufgereinigt. So erfolgt z.B. die Aufreinigung von N-Boc-D-Leu-O-(N-Ac-L-Thr)-L-Leu-L-Phe-OMe über eine FP Si 12 g Säule mit einer Flussrate von 30 mL/min. Dafür wird das Peptid in 5 mL DCM dispergiert und durch Flash-Chromatographie mit einem Gradienten von 0 - 2 min: 0 % B, 2 - 4 min: 20 % B, 4 - 6 min: 40 % B, 6 - 14 min: 60 - 80 % B, 14 - 23 min: 100 % B aufgereinigt.

Beispiel 2 in Abbildung 9:

[0087] Das erhaltene Dipeptid (z.B. N-Boc-D-Leu-L-Phe-OMe) wird mit 2 Äquivalenten Anisol in Dichlormethan (DCM) versetzt und tropfenweise Trifluoressigsäure zugegeben, bis eine 20%ige Lösung erreicht wird. Die Reaktion wird nach ca. 2 - 2,5 h bei Raumtemperatur durch Neutralisation mit 3 M Kaliumhydroxidlösung gestoppt und mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrige Ammoniumchlorid-Phase wird wiederum dreimal mit Dichlormethan gegenextrahiert und alle organischen Phasen vereinigt und unter Vakuum eingeengt.

Beispiel 3 in Abbildung 9:

[0088] Ein Äquivalent der freien Säure z.B. N-Boc-L-Leu-COOH (0.2M) wird in 8 mL DCM vorgelegt und für 30 min bei Raumtemperatur mit 1.5 Äquivalenten EDC-HCl und 0.3 Äquivalenten 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) vorreagieren lassen. Anschließend wird bei anfangs 0 °C 1 Äquivalent (0.2 M) von N-Ac-L-Thr-OMe in 8 mL DCM zur Reaktion hinzugefügt und für 18 h inkubieren gelassen. Das Produkt wird mit 30 mL 1 M Salzsäure, zweimal 30 mL Ammoniumchlorid-Lösung und 30 mL Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit 50 mL DCM gegenextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat und in vacuo getrocknet.

Beispiel 4 in Abbildung 9:

[0089] Der erhaltene Ester z.B. N-Boc-L-Leu-O-(N-Ac-L-Thr-OMe) wird in Dichlorethan (DCE) gelöst und mit 6 Äquivalenten Trimethylzinnhydroxid versetzt. Die Reaktion wird nach 26 - 64 h bei 80 °C unter Argonatmosphäre durch Abkühlen beendet und das Reaktionsgemisch in vacuo getrocknet. Das eingetrocknete Reaktionsprodukt wird in 50 mL Ethylacetat wiederaufgenommen und dreimal mit je 50 mL 1 M HCl sowie einmal mit 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat erneut gegenextrahiert und alle Ethylacetat-Phasen vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeengt.

Beispiel 5 in Abbildung 9:

[0090] Für das Entschützen des linearen Tetrapeptids wird aufgrund der Säure- bzw. Basenlabilität des intramolekularen Esters Trimethylsilyliodid (TMS-I) als nicht-hydrolytisches Deprotektionsagens verwendet. Dabei wird das Peptid z.B. N-Boc-L-Leu-O-(N-Ac-L-Thr-)-D-Leu-L-Leu-COOH in 3 mL deuteriertem Chloroform ($CDCl_3$) gelöst mit 1.5 Äquivalenten TMS-I versetzt. Die Reaktion wird unter Argonatmosphäre nach 3.5 h bei 50 °C durch Zugeben eines Überschusses an Methanol beendet und in vacuo getrocknet. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung per Flash-Chromatographie über eine FP ID C18 12 g-Säule. Dabei werden die Proben in Methanol/Wasser (83/17) resuspendiert und 4.8 mL injiziert mit Wasser als Eluent A und Acetonitril als Eluent B und einer Flussrate von 30 mL/min unter Verwendung von folgendem Gradienten: 0 - 2.5 min: 0 % B, 2.5 - 5 min: 20 % B, 5 - 7.5 min: 40 % B, 7.5 - 9.5 min: 60 % B, 9.5 - 11.5 min: 80 % B, 11.5 - 15.5 min: 100 % B.

Beispiel 6 in Abbildung 9:

[0091] Die finale Cyclisierung der Depsipeptide erfolgt mit 2.5 mM des entschützten linearen Peptides in einem Gemisch aus DCM/Dimethylsulfaoxid (DMSO) (95/5) und wird mit 3 Äquivalenten O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HATU) gestartet.

[0092] Wenn nach Reaktionsverlaufkontrolle mittels LC-MS noch Substrat erkennbar ist, wird erneut HATU zugegeben. Die Reaktion wird nach max. 48 h durch Einengen des DCM in vacuo beendet und der Rückstand in insgesamt 5 mL DMSO resuspendiert und mit Hilfe von Flash-Chromatographie über eine FP Si C18 12 g Säule bei 30 L/min Flussrate aufgereinigt. Dabei wird folgender Gradient mit Wasser als Eluent A und Acetonitril als Eluent B verwendet: 0 - 2.5 min: 0 % B, 2.5 - 5 min: 20 % B, 5 - 7.5 min: 40 % B, 7.5 - 10 min: 60 % B, 10 - 12.5 min: 80 % B, 12.5 - 17.2 min: 100 % B.

[0093] Die vereinten gesammelten Fraktionen werden in vacuo eingeengt und in 1.5 mL MeOH resuspendiert und per semipräparativer HPLC weiter aufgereinigt. Dafür wird ein Agilent 1200-System mit einer Agilent Eclipse XDB-C18-Säule (250 x 9.4 mm, 5 µM) mit Wasser + Ameisensäure (0.1 %) als Eluent A und Acetonitril als Eluent B mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 mL/min und einer Säulentemperatur von 12 °C verwendet. Es werden pro Lauf 50 µL injiziert und bei 220 nm detektiert. Dabei wird ein Gradient von 0 - 1.5 min: 30

% B, 1.5 - 16.5 min: 30 - 100 % B, 16.5 - 19 min: 100 % B, 19 - 19.5 min: 100 - 30 % B, 19.5 - 22 min: 30 % B genutzt.

5. Ausführungsbeispiel

-Mortierella alpina- Isolate JMRC: SF:10519 und JMRC:SF:10520-

[0094] Von insgesamt 23 untersuchten Stämmen konnten die Cycloacetamide ausschließlich aus den beiden Stämmen JMRC:SF:10519 und JMRC:SF:10520 isoliert werden, wobei JMRC:SF:10519 = DSM 34346 = der Produzentenstamm ist. Beide Stämme stammen aus einer alpinen Region und wurden bereits in den Jahren 2004-2011 gesammelt.

[0095] Die Stämme wurden in der Jena Microbial Ressource Collection (JMRC) deponiert und im Jahr 2013 anhand ihrer LSU- (large ribosomal subunits) und ITS- (internal transcribed spacer) Sequenzen durch Maximum-Liklyhood-Analysen in die Gruppe 6 der Familie der Mortierellacea eingeordnet (Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, Papp T, Vágvölgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K. A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. Persoonia. 2013; 30:77-93. doi: 10.3767/003158513X666268. PMID: 24027348; PMCID: PMC3734968.).

[0096] Vor der Naturstoffanalyse wurden die Stämme anhand ihrer mittels PCR-Technik amplifizierten ITS-Region als Mortierella alpina JMRC:SF:10519 (= DSM 34346) und JMRC:SF:10520 re-identifiziert.

[0097] Beide Mortierella alpina- Isolate weisen eine zueinander identische ITS-Sequenz auf und sind wiederum zu 96,4% identisch zum Referenzgenom-Stamm M. alpina ATCC32222 (Wang L, Chen W, Feng Y, Ren Y, Gu Z, Chen H, Wang H, Thomas MJ, Zhang B, Berquin IM, Li Y, Wu J, Zhang H, Song Y, Liu X, Norris JS, Wang S, Du P, Shen J, Wang N, Yang Y, Wang W, Feng L, Ratledge C, Zhang H, Chen YQ. Genome characterization of the oleaginous fungus Mortierella alpina. PLoS One. 2011;6(12):e28319. doi: 10.1371/journal.pone.0028319. Epub 2011 Dec 8. PMID: 22174787; PMCID: PMC3234268.). Das ITS-Sequenz-Alignment der beiden Produktionsstämme ist nachfolgend in der **Abb.** 10 dargestellt.

[0098] Naturstoffchemisch lassen sich die 2 Mortierella alpina- Stämme dadurch charakterisieren, dass sie neben den o.g. Cycloacetamide A-F (= Verbindungen 1-6) auch Malpinin A (m/z 859.4827 $[M+H]^+$), Malpibaldin A (m/z 626.4062 $[M+H]^+$) und Malpicyclin C (m/z 629.4343 $[M+H]^+$) produzieren.

[0099] Während Mortierella alpina- Isolat JMRCSF:10519 zusätzlich Calpinactam (m/z 768.4330 $[M+H]^+$) produziert, sind die Calpinactam-Produktionslevel von Mortierella alpina- Isolat JMRC:SF:10520 unter dem Detektionsniveau.

[0100] Daher wurde Mortierella alpina- Isolat JMRC:SF:1010519 Als Produzentenstamm DSM 34346 ausgewählt.

6. Ausführungsbeispiel

Bioaktivität der Cycloacetamide A und B (=Verbindung 1 und 2)-

[0101] Die Cycloacetamide A und B (=Verbindung 1 und 2) wurden einem intensiven Bioaktivitätsscreening unterzogen.

[0102] Cycloacetamide A und B (=Verbindung 1 und 2) zeigen ab 60 µg/ml eine insektizide Wirkung auf Larven der Schwarzbäuchigen Fruchtfliege (Drosophila melanogaster) (siehe **Abb.** 10).

[0103] Eine repellente Wirkung auf Insekten ist nicht festzustellen, sodass hier von einem toxischen Effekt auszugehen ist.

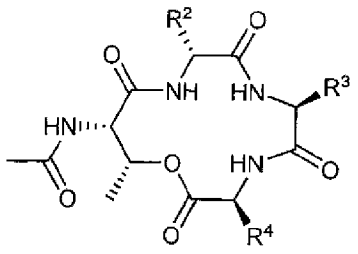
[0104] Für Cycloacetamide A und B (=Verbindung 1 und 2) konnten keine antimikrobiellen (Pilze / Bakterien), cytotoxischen oder hormonfreisetzenden Wirkungen festgestellt werden (siehe Tabelle 5). Ebenso sind die Substanzen nicht gegen Trypanosomen oder Nematoden wirksam (je >100 µg/ml).

[0105] Von besonderem Vorteil ist, dass die hier bereitgestellten Cycloacetamide halogenfreie Cyclooligopeptide sind, die durch einen Pilz Mortierella spec., insbesondere Mortierella alpina, besonders vorteilhaft

dem Produzentenstamm Mortierella alpina DSM 34346 auf natürliche Weise gebildet werden und protease-stabil sind. Sie stellen damit eine nachhaltige, ökologisch verträgliche Alternative zu herkömmlichen Insektiziden dar.

[0106] Alle in der Beschreibung, den Ausführungsbeispielen und den nachfolgenden Ansprüchen dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

Tabelle 1



#	Name	R^2	R^3	R^4	$[M+H]^+$	DBE	Summenformel
1	Cycloacetamid A	D-Leu	L-Leu	L-Leu	482.3104	6	$C_{24}H_{42}N_4O_6$
2	Cycloacetamid B	D-Leu	L-Phe	L-Leu	516.2948	10	$C_{27}H_{40}N_4O_6$
3	Cycloacetamid C	D-Leu	L-Phe	L-Phe	550.2791	14	$C_{30}H_{38}N_4O_6$
4	Cycloacetamid D	D-Phe	L-Phe	L-Leu	550.2791	14	$C_{30}H_{38}N_4O_6$
5	Cycloacetamid E	D-Phe	L-Phe	L-Phe	584.2635	18	$C_{33}H_{36}N_4O_6$
6	Cycloacetamid F	Leu	Tyr	Leu	532.2897	10	$C_{27}H_{40}N_4O_7$

Tabelle 2

	δ ^{13}C [ppm]	type	δ ^{1}H [ppm], M (J [Hz])	COSY	HMBC
	Acetat				
1	170.11	C=O			
2	22.22*	CH_3	1.96		1
	L-Threonin				
3	169.51	C=O			
4	55.16	CH	4.62, dd (9.4, 4.4)	4-NH, 5	1, 3
		NH	8.05, d (9.3)	4	1, 4
5	71.02	CH	5.19, dq (6.4; 4.6)	4, 6	3*, 6, 19*
6	15.00	CH_3	1.18, d (6.5)	5	4, 5
	D-Leucin				
7	171.44	C=O			
8	51.44	CH	4.36, m	8-NH, 9	3, 7, 9, 10
		NH	7.84, d (8.2)	8	3, 8
9	38.03	CH_2	a: 1.65, m	8, 10*	3, 8, 10*
			b: 1.45, m	8	8, 10*
10	24.33*	CH	1.46, m*	11*, 12*	
11	21.99	CH_3	0.85, d (6.5)	10*	9, 10, 12
12	22.56	CH_3	0.89, d (6.6)	10*	9, 10
	L-Leucin				
13	171.24	C=O			
14	49.94	CH	4.20, m	14-NH, 15	7*, 13*, 15, 16*

	δ ^{13}C [ppm]	type	δ ^{1}H [ppm], M (J [Hz])	COSY	HMBC
		NH	7.48, d (7.8)	14	7, 14
15	39.63**	CH_2	a: 1.63, m	14	13*, 14, 16*
			b: 1.42, m	14	14, 16*
16	24.43*	CH	1.51*, m	17*, 18*	
17	22.06	CH_3	0.86, d (6.6)	16*	15, 16
18	22.49	CH_3	0.87, d (6.9)	16*	15, 16
	L-Leucin				
19	170.13	C=O			
20	52.61	CH	4.18, m	20-NH, 21	19*, 21, 22*
		NH	8.30, d (8.7)	20	13, 20
21	39.24**	CH_2	a: 1.56	20	20, 22, 24
			b: 1.52	20	20, 22
22	24.13	CH	1.60	23, 24	
23	22.56	CH_3	0.88, d (7.2)	22	21, 22
24	21.12	CH_3	0.81, d (6.5)	22	21, 22

Tabelle 3

	δ ^{13}C [ppm]	type	δ ^{1}H [ppm], M (J [Hz])	COSY	HMBC
	Acetat				
1	170.30	C=O			
2	22.50	CH_3	1.95, s		
	L-Threonin				
3	169.80	C=O			
4	55.13	CH	4.61, dd (9.4, 4.3)	4-NH, 5	3, 5, 6
		NH	8.0, d (9.4)	4	2*, 4, 5
5	71.23	CH	5.18, dq (6.4, 4.6)	4, 6	6
6	15.15	CH_3	1.17, d (6.5)	5	4, 5
	D-Leucin				
7	171.11	C=O			
8	51.40	CH	4.35, m	8-NH, 9	9
		NH	7.89, d (8.3)	8	3, 8
9	37.71	CH_2	a: 1.56, m	8, 9b	8
			b: 1.31, m	8, 9a	7, 8
10	24.20	CH	1.20, m	11, 12	8
11	21.97	CH_3	0.73*, d (6.6)	10	9, 10, 12
12	21.87	CH_3	0.81 *, d (6.6)	10	9
	L-Phenylala-nin				
13	170.42	C=O			
14	55.66	CH	4.35, m	14-NH	13*, 15, 16
		NH	8.34, d (9.1)	14, 15	7, 14, 15
15	36.20	CH_2	a: 3.00, dd (13.6, 5.6)	14,15b	14, 16, 17, 21

	δ ^{13}C [ppm]	type	δ ^{1}H [ppm], M (J [Hz])	COSY	HMBC
			b: 2.81, dd (13.5, 10.2)	14,15a	14, 16, 17, 21
16	137.87	C (ar)			
17,21	128.90	CH (ar)	7.23*, m		17, 19, 21
18,20	128.02	CH (ar)	7.25*, m		16, 18, 20
19	126.25	CH (ar)	7.18, m		17, 21
	L-Leucin				
22	170.39	C=O			
23	50.19	CH	4.12, dt (7.9, 6.2)	23-NH, 24	24, 25
		NH	7.70, d (7.7)	23	13*, 23
24	39.29**	CH_2	a: 1.60, m	23, 24b	23
			b: 1.50, m	23, 24a	23, 25
25	23.99	CH	1.43, m	26, 27	23, 24, 26, 27
26	22.89	CH_3	0.86, d (6.5)*	25	24, 25
27	22.67	CH_3	0.84, d (6.5)*	25	24, 26

Tabelle 4

	δ ^{13}C [ppm]	type	δ ^{1}H [ppm], M (J [Hz])	COSY	HMBC
	Acetat				
1	174.51	C=O			
2	22,63	CH_3	2.10, s		1
	L-Threonin				
3	172.16	C=O			
4	57.43	CH	4.74, d (2.8)	5	1, 3, 5, 6
5	73.67	CH	5.44, dq (6.3, 2.9)	4, 6	4, 6, 22
6	16.03	CH_3	1.24, d (6.4)	5	4, 5
	D-Leucin				
7	174.32	C=O			
8	53.15	CH	4.50, (t, 7.8 Hz)	9	7, 9
9	38.77	CH_2	a: 1.64, m	8, 9b	7, 8
			b: 1.46, m	8, 9a	7, 8
10	25.70*	CH	1.38, m	11, 12	11, 12
11	22.59*	CH_3	0.88, m*	10	
12	22.53*	CH_3	0.84, m*	10	
	L-Phenylala-nin				
13	172.86	C=O			
14	57.40	CH	4.57, (dd, 8.6, 7.4)		7, 13, 15, 16, 22
15	37.73	CH_2	a: 3.10, dd (13.8, 7.2)	14, 15b	13, 14, 16, 17, 21
			b: 2.87, dd (13.6, 9.0)	14, 15a	13, 14, 16, 17,
16	138.17	C (ar)			21
17,21	130.05	CH (ar)	7.25*, m		17, 19, 21

	δ ^{13}C [ppm]	type	δ ^{1}H [ppm], M (J [Hz])	COSY	HMBC
18,20	129.51	CH (ar)	7.27*, m		16, 18, 20
19	127.86	CH (ar)	7.21, m		17, 21
	L-Leucin				
22	171.66	C=O			
23	52.63	CH	4.11, dt (t, 7.2 Hz)	24	22, 24, 25
24	40.32**	CH_2	a: 1.66, m	23, 24b	22, 23, 25, 26, 27
			b: 1.58, m	23, 24a	22, 23, 25
25	25.93 *	CH	1.36*, m	26, 27	
26	23.12*	CH_3	0.86*, m	25	
27	22.67*	CH_3	0.82*, m	25	

Tabelle 5

	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4	Methode 5
HPLC-System®	Präparative HPLC	Präparative HPLC	Präparative HPLC	Präparative HPLC	Präparative HPLC
	Agilent 1260	Agilent 1260	Agilent 1260	Agilent 1260	Agilent 1260
Lösungsmittel A	H_2O + 0.1 % TFA	H_2O + 0.1 % TFA	H_2O + 0.1% TFA	H_2O + 0.1% TFA	H_2O + 0.1% TFA
Lösungsmittel B	Acetonitril	Acetonitril	Acetonitril	Acetonitril	Acetonitril
Gradient für B	0-0.5 min: 35%,	0-0.5min: 45%,	0-0.5 min: 35%,	0-0.5 min: 70%,	0-0.5 min: 80%,
	0.5-13.5 min: 35-80 %,	0.5-20 min: 45-100 %,	0.5-12.5 min: 35-80 %,	0.5-6 min: 70-85 %,	0.5-10.5 min: 80-100 %,
	13.5-17 min: 80-100 %,	10-11 min: 100 %,	12.5-16 min: 80-100 %,	6-13.5 min: 85-100 %,	10.5-16.0 min: 100 %,
	17-19 mm: 100 %,	11-11.5 min: 100-45 %,	16-17 min: 100 %,	13.5-14.5 min: 100 %,	16-16.5 min: 100-80 %,
	19-19.5 min: 100-35 %,	11.5-13 min: 45 %	17-17.5 min: 100-35 %,	14.5-15 min: 100-70 %,	16.5-21 min: 80%
	19.5-21 min: 35 %		17.5-19 min: 35 min	15-16.5 min: 70 %	
Temperatur	12 °C	12 °C	12 °C	12 °C	12 °C
Fließgeschwindigkeit Säule	25 mL/min	2 mL/min	2 mL/min	2 mL/min	3.5 mL/min
	Agilent Eclipse XDB-C18	Thermo Fisher Hypercarb	Agilent Eclipse XDB-C18	Phenomenex Synergi-Hydro-RP	Thermo Fisher Hypercarb
Säulenmaße	250 × 9.4 mm, 5 µm	150 × 4.6 mm, 5µm	250 × 9.4 mm, 5 µm	250 × 10 mm, 4 µm	150 × 4.6 mm, 5 µm

Tabelle 6

Vbdg.	**pathogene Bakterien[a]**	**Mycobakterien[b]**	**filamentöse Bakterien[c]**	**Pilze[d]**	**Säugerzelllinien[e]**	**menschliche Makrophagen[f]**	**Trypanosomen[g]**	**Nematoden[h]**
1	>1000 µg mL^{-1}	>125 µg mL^{-1}	n.b.	>1000 µg mL^{-1}	>100 µg mL^{-1}	>14.4 µg mL^{-1}	>150 µg mL^{-1}	>100 µg mL^{-1}
2	>1000 µg mL^{-1}	>125 µg mL^{-1}	> 516 µg mL^{-1}	>1000 µg mL^{-1}	>100 µg mL^{-1}	>15.5 µg mL^{-1}	>150 µg mL^{-1}	>100 µg mL^{-1}

Es folgt ein Sequenzprotokoll als elektronisches Dokument. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Baldeweg F, Warncke P, Fischer D, Gressler M. Fungal Biosurfactants from Mortierella alpina. Org Lett. 2019 Mar 1;21(5):1444-1448 [0007, 0008]
- Wurlitzer JM, Stanišić A, Wasmuth I, Jungmann S, Fischer D, Kries H, Gressler M. Bacterial-Like Nonribosomal Peptide Synthetases Produce Cyclopeptides in the Zygomycetous Fungus Mortierella alpina. Appl Environ Microbiol. 2021 Jan 15;87(3):e02051-20 [0007]
- Koyama N, Kojima S, Nonaka K, Masuma R, Matsumoto M, Omura S, Tomoda H. Calpinactam, a new anti-mycobacterial agent, produced by Mortierella alpina FKI-4905. J Antibiot (Tokyo). 2010 Apr;63(4):183-6 [0007]
- Edgington S, Thompson E, Moore D, Hughes KA, Bridge P. Investigating the insecticidal potential of Geomyces (Myxotrichaceae: Helotiales) and Mortierella (Mortierellacea: Mortierellales) isolated from Antarctica. Springerplus. 2014 Jun 9,3:289. doi: 10.1186/2193-1801-3-289 [0010]
- Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, Papp T, Vägvölgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K. A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. Persoonia. 2013; 30:77-93 [0011]
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins (Basel). 2014 Dec 11;6(12):3296-325 [0015]
- Xu Y, Orozco R, Kithsiri Wijeratne EM, Espinosa-Artiles P, Leslie Gunatilaka AA, Patricia Stock S, Molnar I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of Beauveria bassiana. Fungal Genet Biol. 2009 May;46(5):353-64 [0018]
- Harder A, Schmitt-Wrede HP, Krücken J, Marinovski P, Wunderlich F, Willson J, Amliwala K, Holden-Dye L, Walker R. Cyclooctadepsipeptides–an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. Int J Antimicrob Agents. 2003 Sep;22(3):318-31 [0019]
- Xu Y, Zhan J, Wijeratne EM, Bums AM, Gunatilaka AA, Molnár I. Cytotoxic and Antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen Beauveria bassiana ATCC 7159. J Nat Prod. 2007 Sep;70 (9):1467-71 [0020]
- Firäková S, Proksa B, Sturdikova M. Biosynthesis and biological activity of enniatins. Pharmazie. 2007 Aug;62(8):563-8 [0020]
- Dornetshuber-Fleiss R, Heffeter P, Mohr T, Hazemi P, Kryeziu K, Seger C, Berger W, Lemmens-Gruber R. Destruxins: fungal-derived cyclohexadepsipeptides with multifaceted anticancer and antiangiogenic activities. Biochem Pharmacol. 2013 Aug 1;86(3):361-77 [0021]
- Pedras MS, Irina Zaharia L, Ward DE. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. Phytochemistry. 2002 Mar;59(6):579-96 [0022]
- K. Nicolaou et al., A mild and selective method for the hydrolysis of esters with trimethyltin hydroxide. Angewandte Chemie 44, 1378-1382 [0081]
- H. A. Grab, Total Synthesis of the Cyclic Depsipeptide Vioprolide D via its (Z)-Diastereoisomer. Angewandte Chemie - International Edition 59, 12357-12361 [0081]
- B. Neises und W. Steglich, Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, Angewandte Chemie 17, 522-524 [0083]
- M. Tsakos et al., Ester coupling reactions-an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products, Natural Product Reports 32, 605-632 [0083]
- Petkovits T, Papp T, Vägvölgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K. A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. Persoonia. 2013; 30:77-93 [0095]
- Wang L, Chen W, Feng Y, Ren Y, Gu Z, Chen H, Wang H, Thomas MJ, Zhang B, Berquin IM, Li Y, Wu J, Zhang H, Song Y, Liu X, Norris JS, Wang S, Du P, Shen J, Wang N, Yang Y, Wang W, Feng L, Ratledge C, Zhang H, Chen YQ. Genome characterization of the oleaginous fungus Mortierella alpina. PLoS One. 2011;6(12):e28319 [0097]

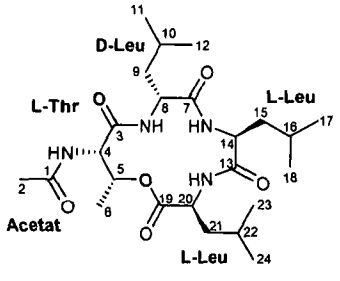
Patentansprüche

1. Cycloacetamide A bis F mit der allgemeinen Formel

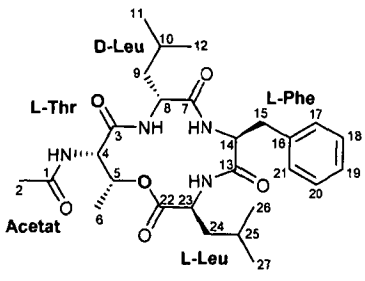
cyclo-(-N-Ac-L-Thr-A-B-C-O-)

wobei L-Thr L-konfiguriertes Threonin darstellt und, in welcher A, B und C unabhängig voneinander gleiche oder verschiedene L- oder D-konfigurierten Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten darstellen, insbesondere Alanin (Ala), Valin (Val), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) oder Tryptophan (Trp).

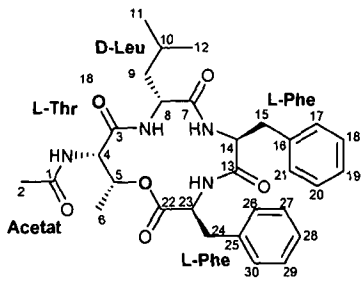
2. Cycloacetamide A bis F gemäß Anspruch 1, wobei



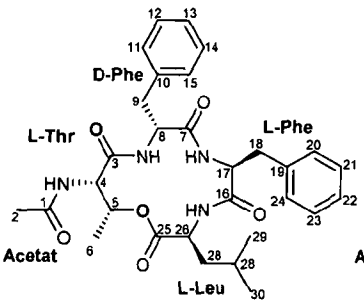
Cycloacetamid A (1)



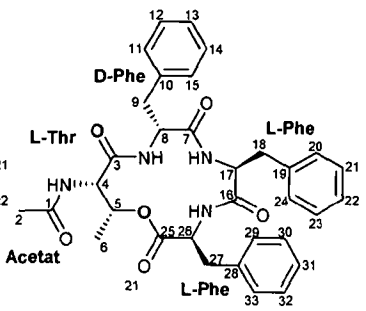
Cycloacetamid B (2)



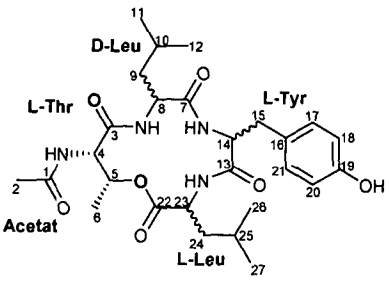
Cycloacetamid C (3)



Cycloacetamid D (4)



Cycloacetamid E (5)



Cycloacetamid F (6)

ist.

3. Verfahren zur Herstellung der Naturstoffe Cycloacetamide A bis F unter Verwendung Mortierella alpina, bei dem Mortierella alpina-Mycel in eine Nährlösung überführt und anschließend kultiviert wird, wobei der Naturstoffe Cycloacetamide A bis F durch Filtration mit der Nährlösung vom Mortierella alpina-Myzel getrennt werden, wobei die Naturstoffe Cycloacetamide A bis F aus dem Pilz Mortierella alpina ohne Fixierung auf einem Träger in einem an sich bekannten Produktionsgefäß in der Nährlösung ohne Verminderung der Scherkraftbelastung hergestellt werden, anschließend

- das abgetrennte Filtrat angesäuert,
- einer Flüssig-Flüssig-Extraktion,
- einer Eindampfung und
- einer Lyophilisation unterzogen wird, wobei
- das gelöste Lyophilisat als aufkonztriertes Extrakt einer präparativen und anschließend semipräparativen HPLC's unterzogen wird, damit
- nach der 1. und 2. semipräparativen HPLC das Cycloacetamid A und das Cycloacetamid B in Reinform vorliegt,
- nach der 3. und 4. semipräparativen HPLC das Cycloacetamid E und
- nach der 5. semipräparativen HPLC das Cycloacetamid C sowie das Cycloacetamid D in Reinform vorliegt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Pilz Mortierella alpina zur Gewinnung der Naturstoffe Cycloacetamide A bis F in einem geschüttelten Erlenmeyerkolben, einem Rührkesselreaktor oder einem gerührten Fermenter kultiviert wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die bebrütete Vorkultur des Pilzes Mortierella alpina zur Produktion des Naturstoffes Cycloacetamide A bis F einer MEP- Nährlösung mit 30 g/L Malzextrakt und 3 g/L Soja-Pepton zugeführt wird, wobei die Temperatur zwischen 4°C und 30°C liegt, der pH-Wert zwischen pH 5 und pH 9 beträgt und die Kultiverungszeit zwischen 3 und 21 Tagen liegt.

6. Verfahren nach Anspruch 3, 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Pilz Mortierella alpina zur erneuten Cycloacetamid A bis F - Gewinnung im Produktionsgefäß wiederverwendet wird, wobei der Pilz im Produktionsgefäß von der Nährlösung getrennt wird und zur Wiederverwendung darin verbleibt und mit neuem Nährmedium versorgt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 3, 4, 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass für einen zyklischen Cycloacetamid A bis F- Gewinnungsprozess die Cycloacetamide A bis F- haltige Nährlösung in Abständen von 10 Tagen aus dem Produktionsgefäß entnommen und durch neue Nährlösung ersetzt wird.

8. Verfahren zur chemischen, nicht-kanonischen Flüssigphasensynthese von Cycloacetamide A bis F unter Herstellung eines kompletten linearen Depsipeptids mit anschließender finaler Makrolaktamisierung umfassend die Teilschritte:
a) lineare Kopplung der jeweils geeignet geschützten AminosäureDerivate,
b) lineare Veresterung der mit einer Aminoschutzgruppe X protektierten Aminosäure C aus der allgemeinen Formel gemäß Anspruch 1 mit TV-Ac-Z-Thr -O, wobei Y eine Alkylhydroxyschutzgruppe darstellt,
c) Abspaltung der Amino- bzw. Carboxylschutzgruppen der jeweils erhaltenen Peptide und
d) Makrolaktamisierung des finalen linearen Depsipeptids,
wobei
die Aminoschutzgruppe X- Schutzgruppen sind, die die vorhandene Aminogruppe vor chemischen Reaktionen schützen und nach Belieben durch saure oder alkalische Hydrolyse, Reduktion oder nukleophilen Angriff wieder abgespalten werden können,
die Blockade der Carboxylfunktion der Aminosäuren als Alkylester Y erfolgt, welcher wiederum durch alkalische oder nukleophile Dealkylierung entschützt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass
• die Deprotektion des Methylesters mit Trimethylzinnhydroxid mit durchgeführt wird,
• die Entschützung der X. Schutzgruppe durch Trimethylsilyliodid erfolgt und
• eine finale Makrolaktamisierung statt -laktonisierung stattfindet.

10. Verwendung von durch Mortierella alpina produzierten oder chemisch synthetisierten Cycloacetamide A bis F als Insektizid.

11. Mortierella alpina DSM 34346 als Produzentenstamm für Cycloacetamid A und Cycloacetamid B.

Es folgen 7 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

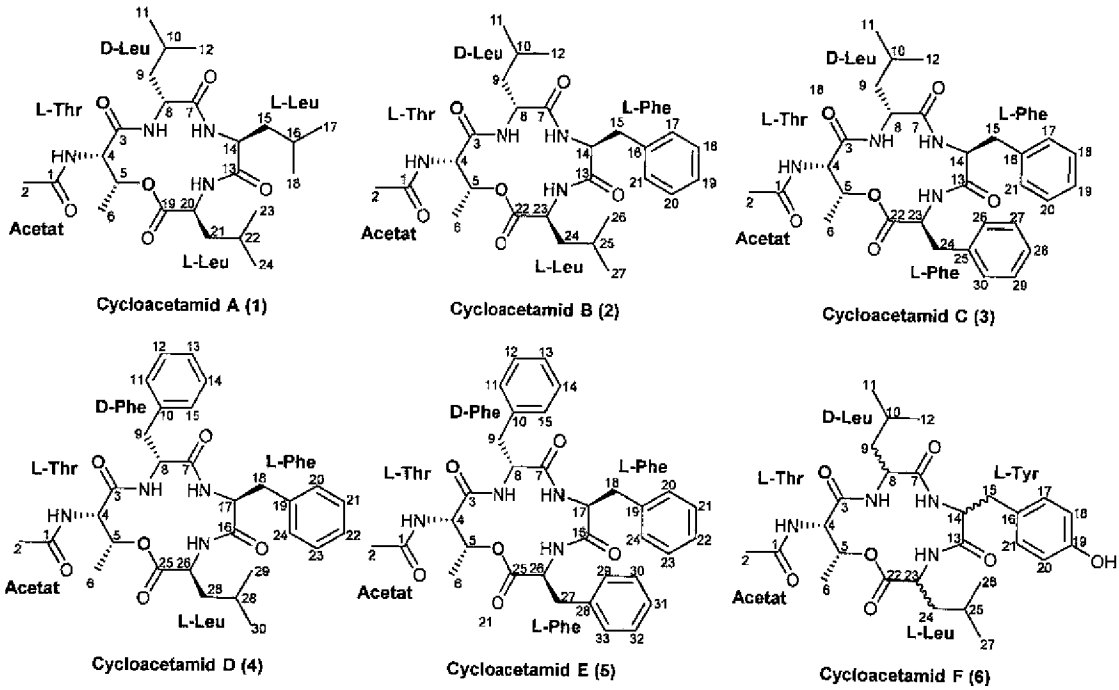


Abb. 1

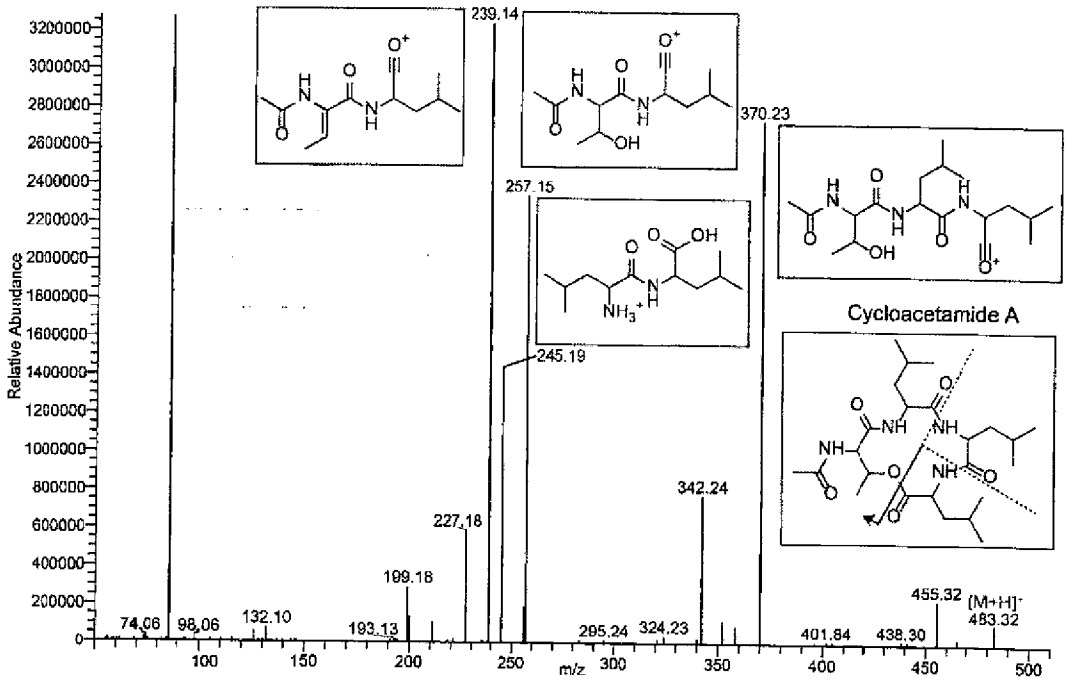

Relative Abundance
m/z
239.14
370.23
257.15
245.19
342.24
227.18
199.18
455.32 [M+H]+
483.32
Cycloacetamide A

Abb. 2

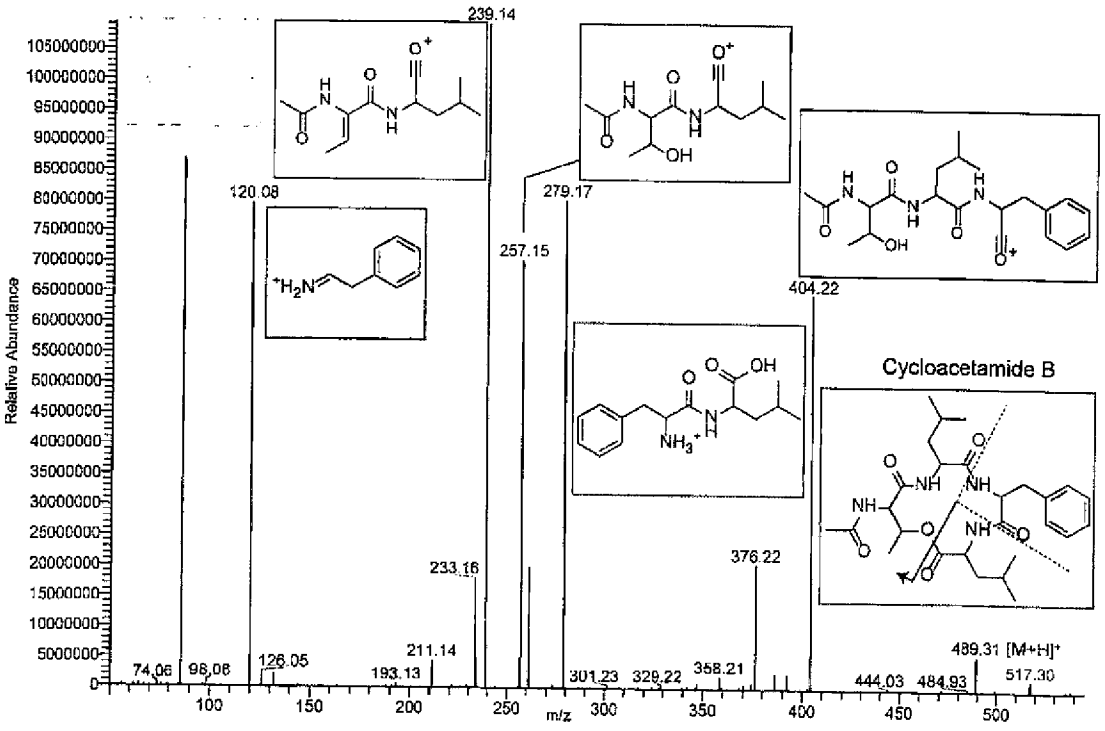

Relative Abundance
m/z
239.14
120.08
279.17
257.15
404.22
376.22
233.16
211.14
489.31 [M+H]+
517.30
Cycloacetamide B

Abb. 3

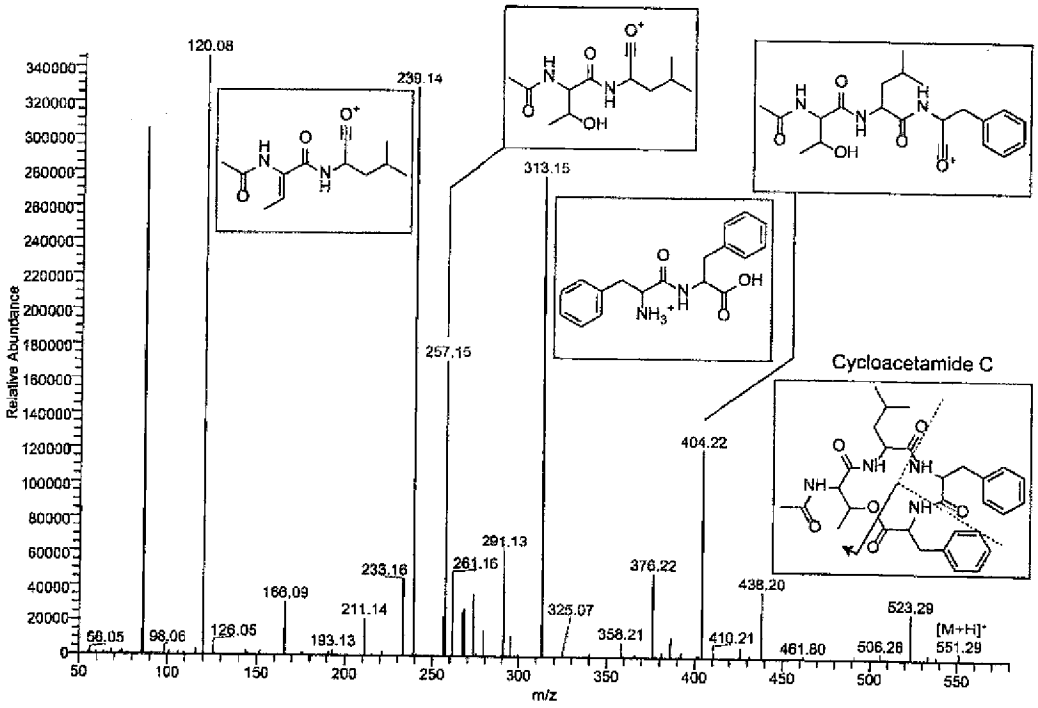

Relative Abundance
m/z
120.08
239.14
313.15
257.15
404.22
291.13
261.16
233.16
376.22
166.09
211.14
438.20
325.07
523.29
[M+H]+
551.29
Cycloacetamide C

Abb. 4

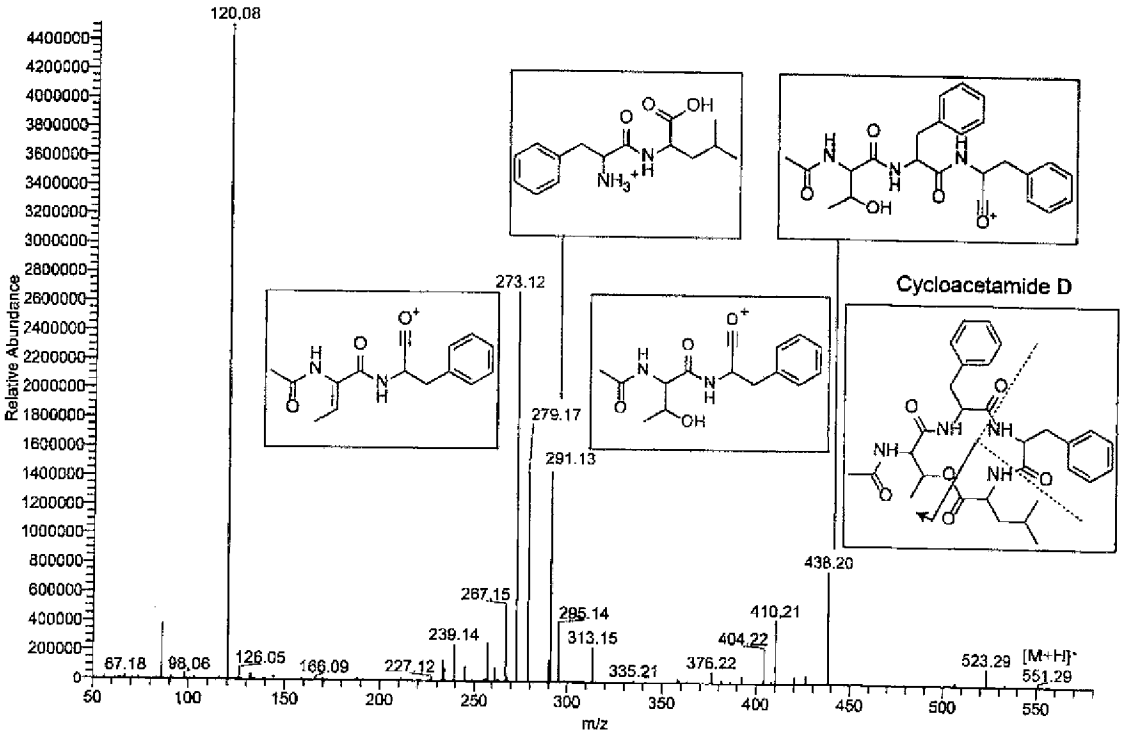

Relative Abundance
m/z
120.08
273.12
279.17
291.13
438.20
267.15
295.14
239.14
313.15
410.21
404.22
376.22
335.21
523.29
[M+H]+
551.29
Cycloacetamide D

Abb. 5

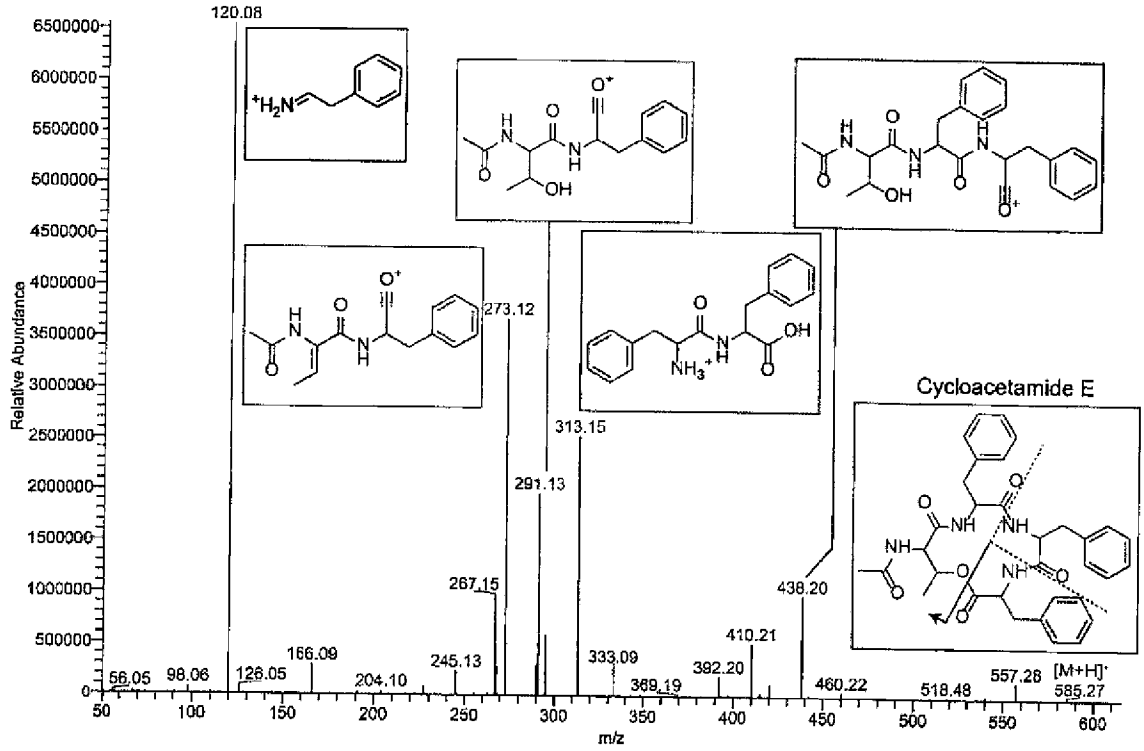

Relative Abundance
m/z
120.08
273.12
313.15
291.13
267.15
438.20
410.21
166.09
245.13
333.09
392.20
369.19
460.22
518.48
557.28
[M+H]+
585.27
56.05
98.06
126.05
204.10
Cycloacetamide E

Abb. 6

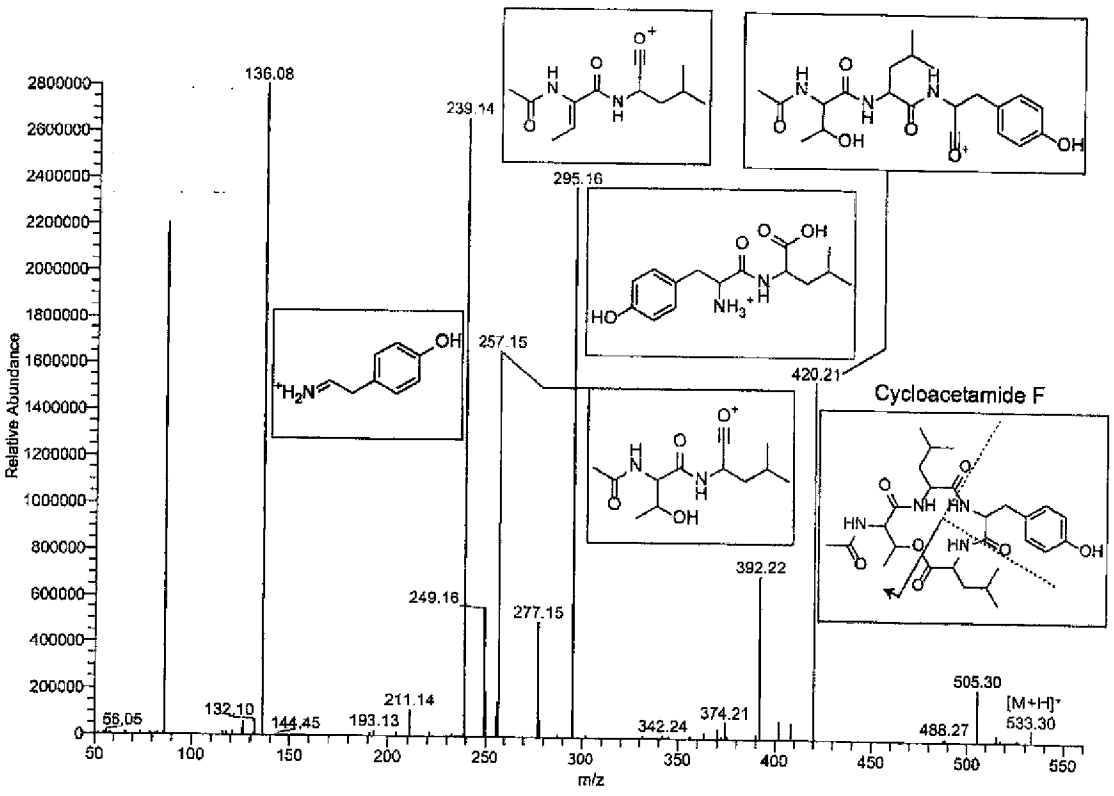

Relative Abundance
m/z
136.08
239.14
295.16
257.15
420.21
249.16
277.15
392.22
211.14
132.10
144.45
193.13
342.24
374.21
505.30
[M+H]+
533.30
488.27
56.05
Cycloacetamide F

Abb. 7

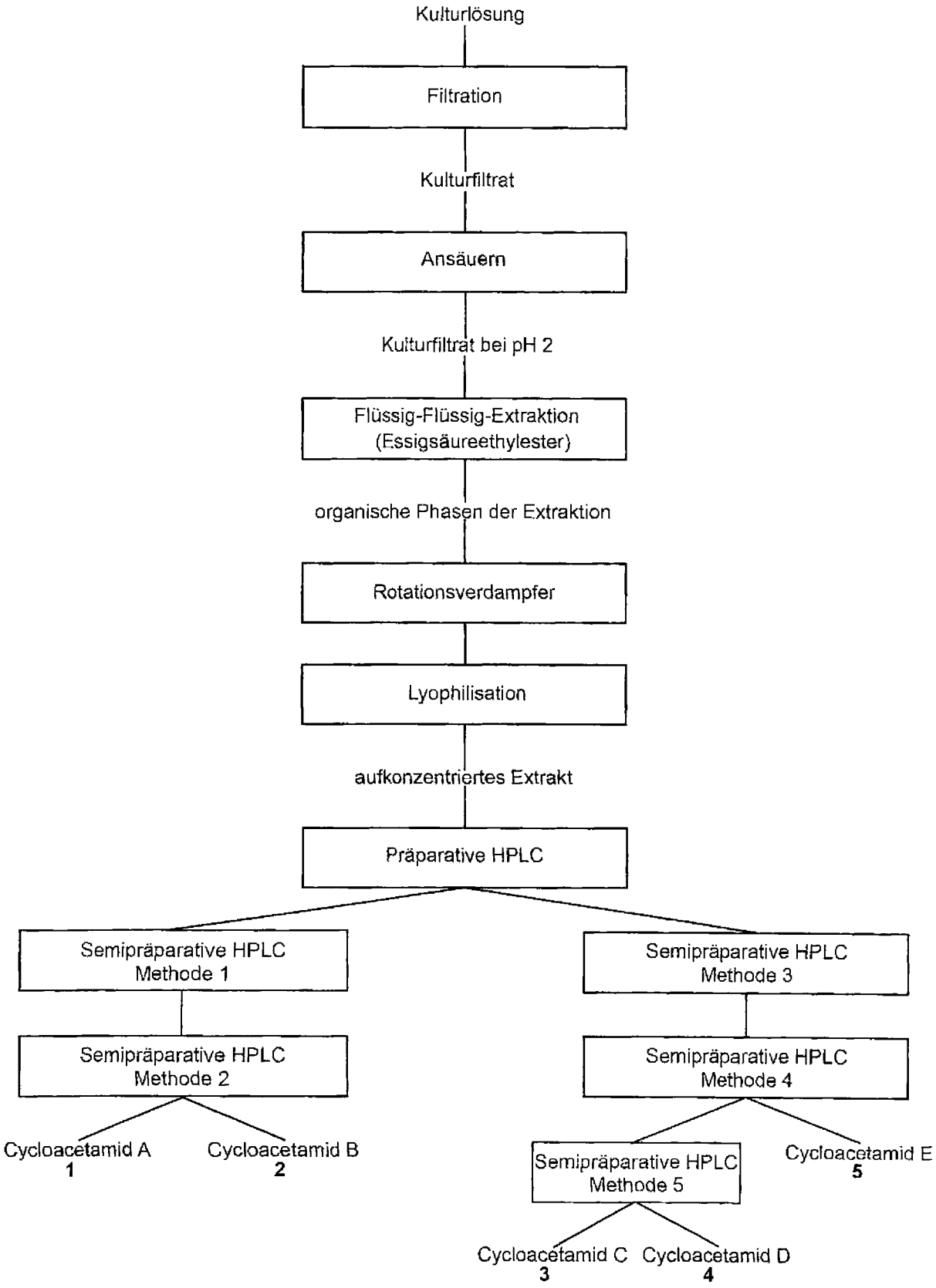

Kulturlösung
Filtration
Kulturfiltrat
Ansäuern
Kulturfiltrat bei pH 2
Flüssig-Flüssig-Extraktion
(Essigsäureethylester)
organische Phasen der Extraktion
Rotationsverdampfer
Lyophilisation
aufkonzentriertes Extrakt
Präparative HPLC
Semipräparative HPLC
Methode 1
Semipräparative HPLC
Methode 2
Cycloacetamid A
1
Cycloacetamid B
2
Semipräparative HPLC
Methode 3
Semipräparative HPLC
Methode 4
Semipräparative HPLC
Methode 5
Cycloacetamid C
3
Cycloacetamid D
4
Cycloacetamid E
5

Abb. 8

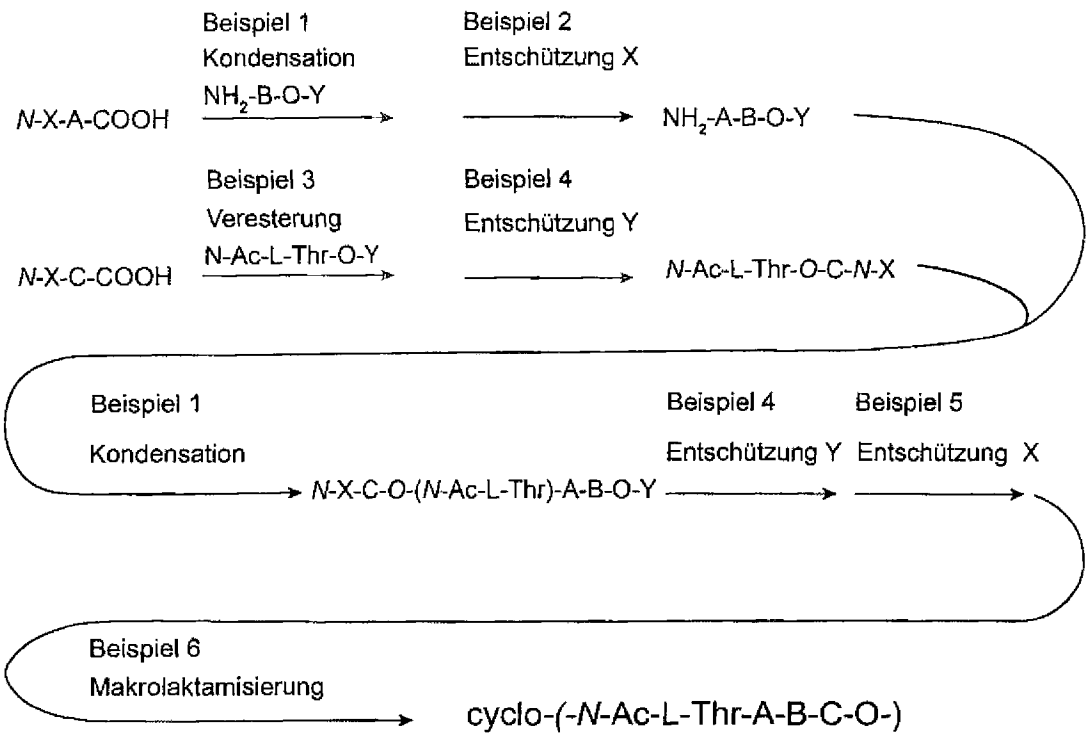

Beispiel 1
Kondensation
NH2-B-O-Y
Beispiel 2
Entschützung X
N-X-A-COOH
NH2-A-B-O-Y
Beispiel 3
Veresterung
N-Ac-L-Thr-O-Y
Beispiel 4
Entschützung Y
N-X-C-COOH
N-Ac-L-Thr-O-C-N-X
Beispiel 1
Kondensation
Beispiel 4
Entschützung Y
Beispiel 5
Entschützung X
N-X-C-O-(N-Ac-L-Thr)-A-B-O-Y
Beispiel 6
Makrolaktamisierung
cyclo-(-N-Ac-L-Thr-A-B-C-O-)

Abb. 9

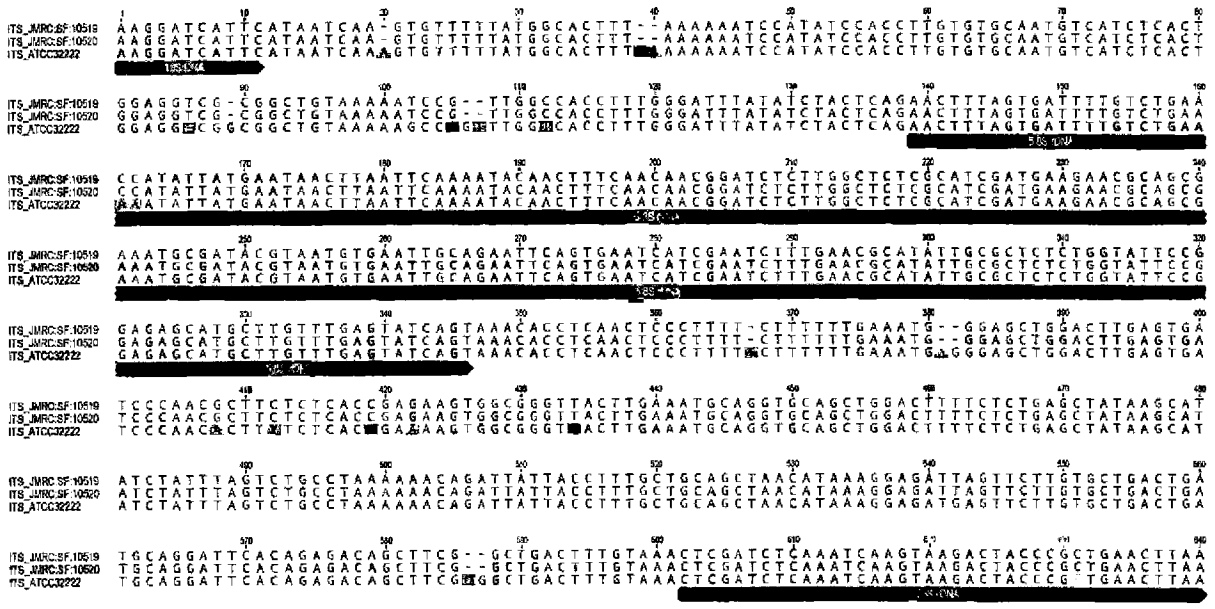


Abb. 10

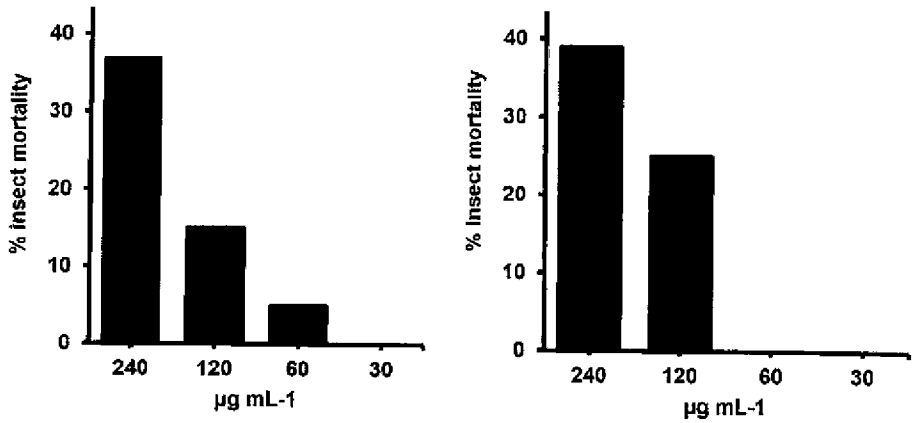


Abb. 11

 Das Dokument wurde durch die Firma Luminess hergestellt.