(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2024 (15.02.2024)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2024/032852 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 5/103 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2023/100587

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. August 2023 (10.08.2023)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2022 120 408.1
12. August 2022 (12.08.2022) DE

(71) Anmelder: **FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA** [DE/DE]; Fürstengraben 1, 07743 Jena (DE). **UNIVERSITÄT BREMEN** [DE/DE]; Bibliotheksstraße 1, 28359 Bremen (DE).

(72) Erfinder: **GRESSLER, Markus**; Max-Steenbeck-Straße 1A, 07745 Jena (DE). **RASSBACH, Johannes**; Richard-Berthold-Straße 45, 07907 Schleitz (DE). **MERSEBURGER, Peter**; Zalmstraat 58, 9000 Gent (BE). **ROHLFS, Marko**; Leubener Straße 5, 28359 Bremen (DE). **BINNEMANN, Niko**; Loebener Straße, 28359 Bremen (DE).

(74) Anwalt: **BIEBER, Björn**; Patent- und Rechtsanwaltskanzlei Bock * Bieber * Donath PG, Humboldtstraße 18, 07743 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) **Title:** CYCLOACETAMIDE, NOVEL NATURAL PRODUCT FROM MORTIERELLA ALPINA, PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF, USE THEREOF AND MORTIERELLA ALPINA DSM 34346

(54) **Bezeichnung:** CYCLOACETAMID, NEUER NATURSTOFF AUS MORTIERELLA ALPINA, VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG, SEINE VERWENDUNG UND MORTIERELLA ALPINA DSM 34346

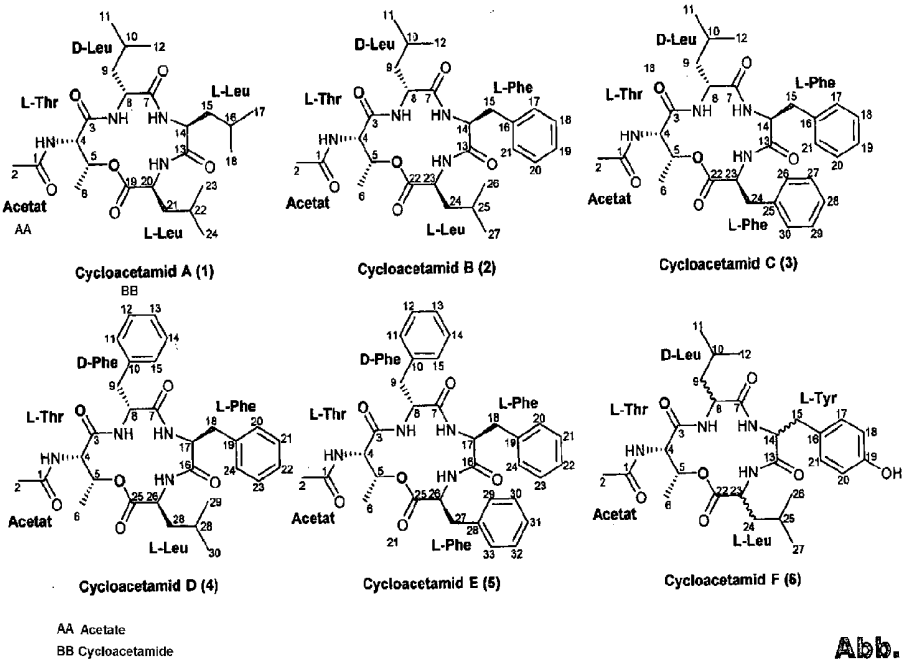


Abb. 1

(57) **Abstract:** The invention relates to the natural product cycloacetamides A to F as novel metabolite from Mortierella alpina, to a process for production thereof, to the use thereof, and to the Mortierella alpina DSM 34346 strain. The object of the present invention, that of specifying a novel natural product (bioactive) from a group of basal evolutionary fungi that has barely been researched to date, such as Mortierella spec., by isolation and identification, which constitutes a novel pharmaceutical lead structure, of providing a biological method for economic and time-saving production thereof with high product yield and without any particular apparatus

WO 2024/032852 A1

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

— *mit Angaben bezüglich hinterlegtem biologischen Material, eingereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung (Regel 13bis Absatz 4 Buchstabe d Ziffer i und Regel 48 Absatz 2 Buchstabe a Ziffer viii)*

— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

complexity and alternatively a chemical synthesis method for preparation thereof, and of explaining the use (bioactivity) thereof, is achieved in that cycloacetamides A to F are provided, which conform to the general formula cyclo-(-N-Ac-L-Thr-A-B-C-O-) where L-Thr denotes L-configured threonine, and in which A, B and C independently represent mutually identical or different L- or D-configured amino acids having nonpolar side chains, especially alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), methionine (Met), phenylalanine (Phe), tyrosine (Tyr) or tryptophan (Trp), wherein the fungus Mortierella alpina is cultured in growth medium and this forms cycloacetamides A to F, which is extracted from the growth medium and separated in the form of a concentrated extract by preparative and semi-preparative HPLC into pure substances of cycloacetamides A to F, wherein cycloacetamides A to F act as insecticide and the producer strain is Mortierella alpina DSM 34346, and a chemical synthesis route is indicated as an alternative to the biological production of cycloacetamides A to F, wherein the cycloacetamides A to F are usable as insecticide.

(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 undder 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.

Cycloacetamid, neuer Naturstoff aus *Mortierella alpina*, Verfahren zu seiner Herstellung, seine Verwendung sowie *Mortierella alpina* DSM 34346

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.).

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).

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

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.).

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).

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 insektizid-produzierender Unternehmen (https://irac-online.org/), werden Insektizide nach ihrem Wirktarget und chemischer Struktur in 26 Klassen eingeteilt.

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

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).

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.

Bassianolid wirkt daher eher unspezifisch (Xu Y, Orozco R, Kithsiri Wijeratne EM, Espinosa-Artiles P, Leslie Gunatilaka AA, Patricia Stock S, Molnár 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).

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.).

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, Burns 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 Fráková S, Proksa B, Sturdíkova M. Biosynthesis and biological activity of enniatins. Pharmazie. 2007 Aug;62(8):563-8. PMID: 17867547).

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).
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.).

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

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, einen neue Naturstoff (Biowirkstoff) aus einer bisher kaum erforschten Gruppe von basal-evolutionären 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.

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

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

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.

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.

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.

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

Cycloacetamide gehören in die Gruppe der Cyclodepsitetrapeptide. Cyclodepsitetrapeptide zeichnen sich durch eine kanonische peptidisch-verknüpfte 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).

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*.

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

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.
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.

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.

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.

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 Abbildung 8 dargestellt.

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-Zeit-Ausbeute durch den gezielten Austausch des Produktionsmediums noch deutlich erhöht.

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.

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

Es zeigen dabei

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

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

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

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

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

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

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

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

Abbildung 9: ein Schema zur chemischen Darstellung von Cycloacetamiden,

Abbildung 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

Abbildung 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 Abbildung 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 Abbildung 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) Agar-diffusionstest gegen *Sporidiobolus salmonicolor, Candida albicans, Penicillium notatum*, e) Zytotoxizität gegen HeLa, U-937, HUVEC, K-562; f) pro/anti-inflammatorische Freisetzung von Prostaglandinen durch Monocyt-abstammenden M2-Makrophagen; g) ATP-basierter Luciferase-Viabilitätsassay mit *Trypanosoma brucei*;
h) *Caenorhabditis elegans*. n.b., nicht bestimmt.

Die Strukturformeln der sechs neu bereitgestellten Substanzen Cylcoacetamide A bis F sind in der Abbildung 1 dargestellt.

Bei den beschriebenen Strukturen (siehe Abbildung 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.

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

Die Strukturaufklärung erfolgte mittels HPLC-MS/MS (siehe dazu Abbildungen 2 bis 7) und die Konfiguration der Aminosäuren wurde mittels Marfey´s Analyse bestimmt.

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).

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

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)-

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.

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.

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.

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.

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**).

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

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.

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

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

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 Abbildung 8).

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-

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

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).

Die Kultivierungsbedingungen entsprechen denen gemäß Ausführungsbeispiel 1.

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

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 l naturstoffhaltige Kulturlösung gewonnen werden.

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.

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 Abbildung 8).

Ausführungsbeispiel 3

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

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

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.

Das Lösungsmittel wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers und Lyophilisation entfernt.

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

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

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).

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

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).

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

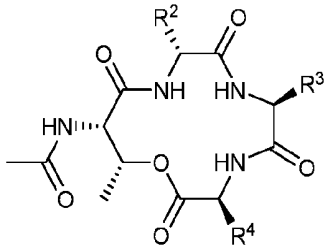
Ausführungsbeispiel 4

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

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**

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.

Wichtige grundsätzliche Teilschritte der Synthese sind dabei die

a) lineare Kopplung der jeweils geeignet geschützten Aminosäure-Derivate
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.

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.

Das besondere dieser technischen Lösung besteht darin, dass die nicht-kanonische 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.

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

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).

Die in Abbildung 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:

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-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,1,3,3,3-tetramethylaminium-tetrafluoroborat) 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.

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:

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:

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:

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:

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:

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*'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HATU) gestartet.
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.
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-

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.

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.).

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.

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 Abbildung 10 dargestellt.

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

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

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

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

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).

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.

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

PCT

(Original in elektronischem Format)
(Dieses Blatt zählt nicht als Blatt der internationalen Anmeldung und ist nicht Teil derselben)

0-1	**Formular PCT/RO/134 Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material**	
0-1-1	Erstellt mit	**DPMAdirektPro 3.4.6**
0-2	**Internationales Aktenzeichen**	PCT/DE2023/100587
0-3	**Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts**	**P3617PCT**

1	**Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist**	
1-1	**Seite**	[28] 1 ▲
1-2	**Zeile**	[13] 11 ▲
1-3	**Angaben betr. Hinterlegung**	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	**DSMZ Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH**
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	**Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig, Germany**
1-3-3	Datum der Hinterlegung	**08. August 2022 (08.08.2022)**
1-3-4	Eingangsnummer	**DSMZ 34346**
1-5	**Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden**	**Alle Bestimmungsstaaten**

▲[ ]
RO/DE

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	**Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen** (ja oder nein)	▲ ja
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	**Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen**	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

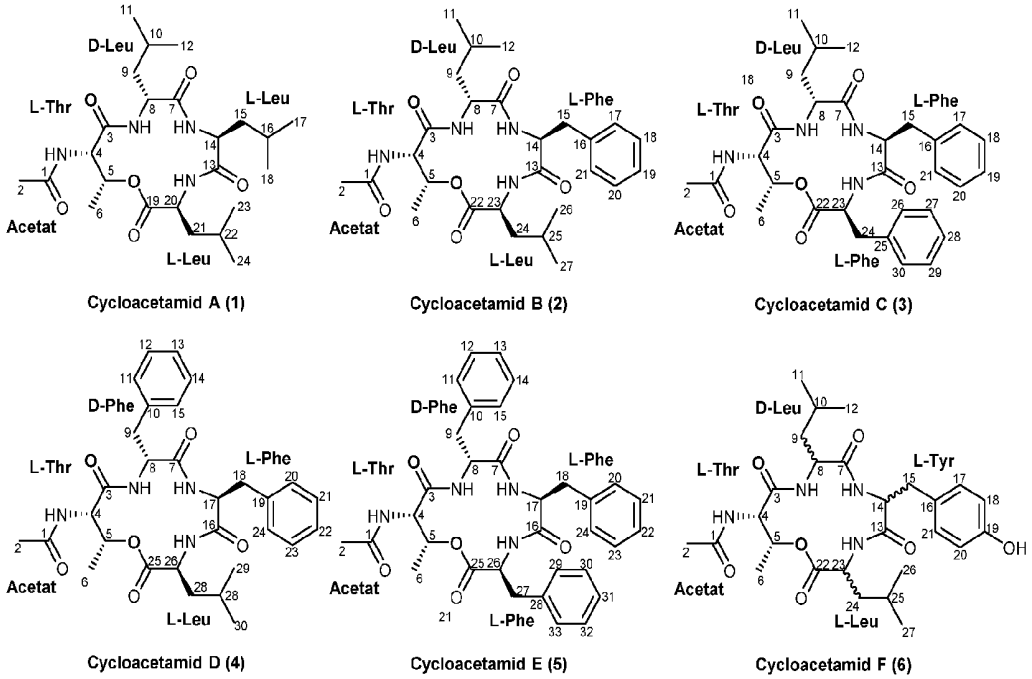
Patentansprüche

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



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 Rührkessel-reaktor 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 Aminosäure-Derivate,

b) lineare Veresterung der mit einer Aminoschutzgruppe X protektierten Aminosäure C aus der allgemeinen Formel gemäß Anspruch 1 mit *N*-Ac-*L*-Thr -O, wobei Y eine Alkylhydroxy-schutzgruppe 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.

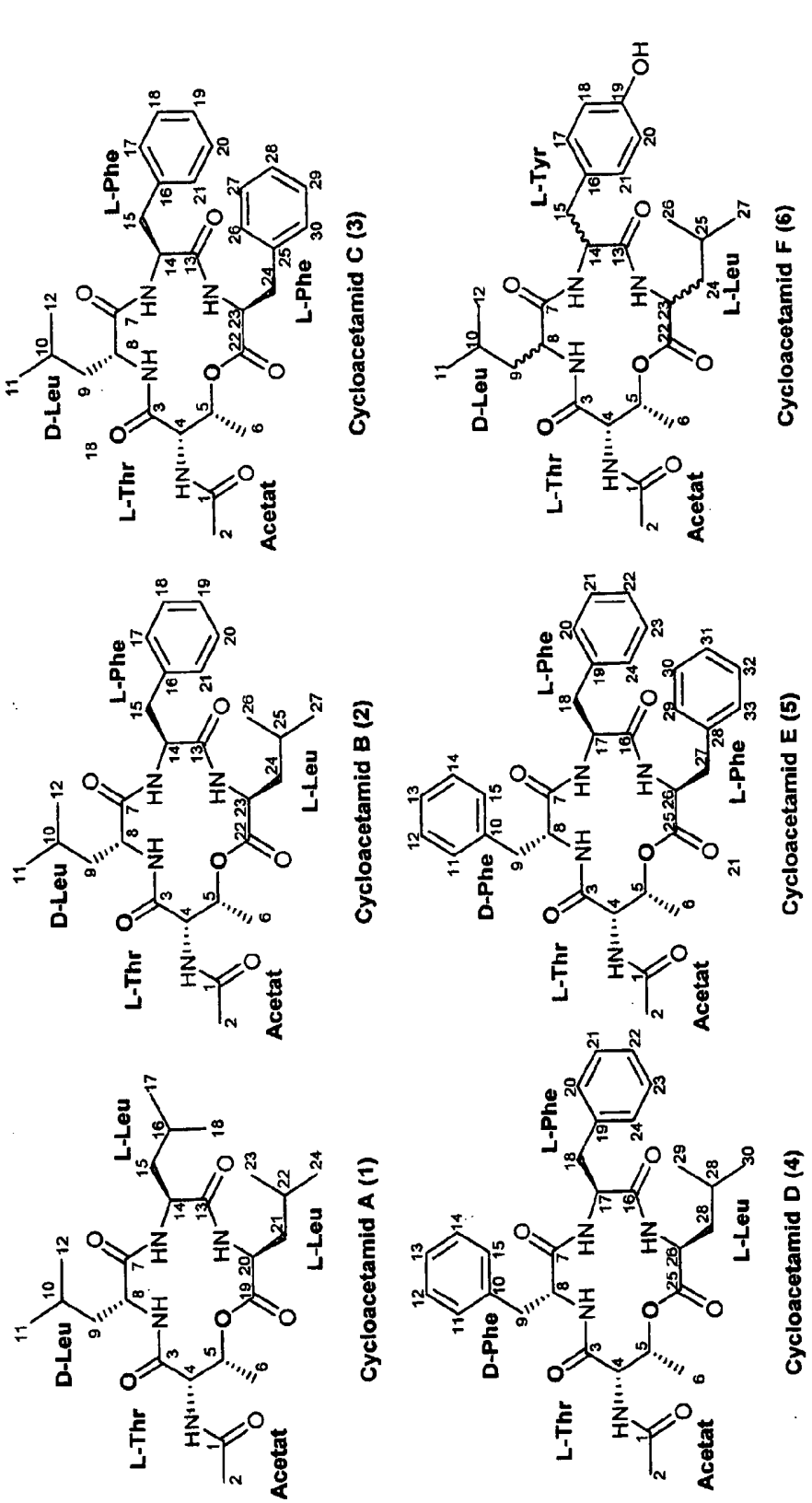

D-Leu
L-Thr
Acetat
L-Leu
L-Phe
L-Tyr
D-Phe
Cycloacetamid A (1)
Cycloacetamid B (2)
Cycloacetamid C (3)
Cycloacetamid D (4)
Cycloacetamid E (5)
Cycloacetamid F (6)

Abb. 1

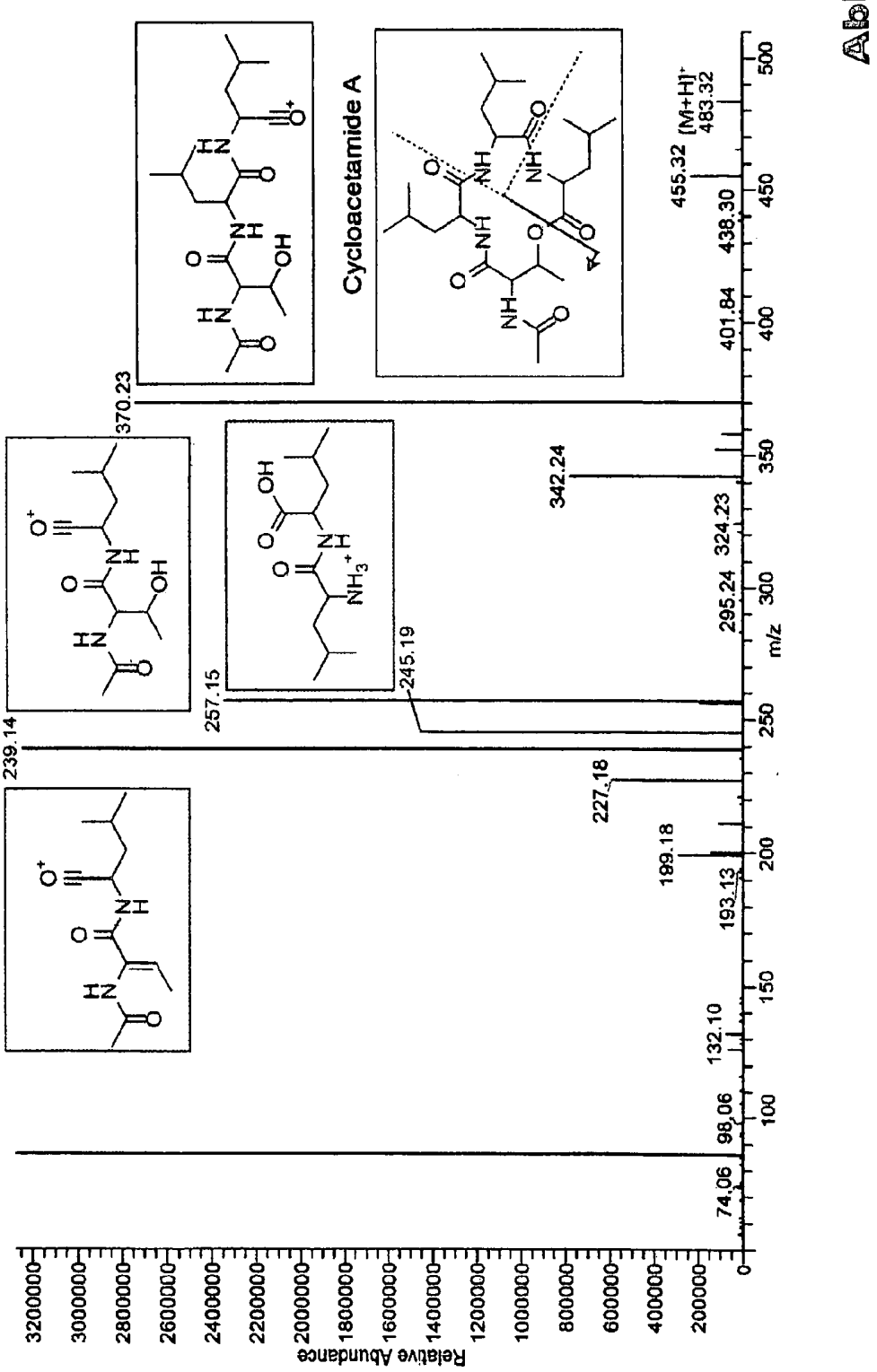

Cycloacetamide A
Relative Abundance
m/z
74.06
98.06
132.10
189.18
193.13
227.18
239.14
245.19
257.15
295.24
324.23
342.24
370.23
401.84
438.30
455.32
483.32
[M+H]+

Abb. 2

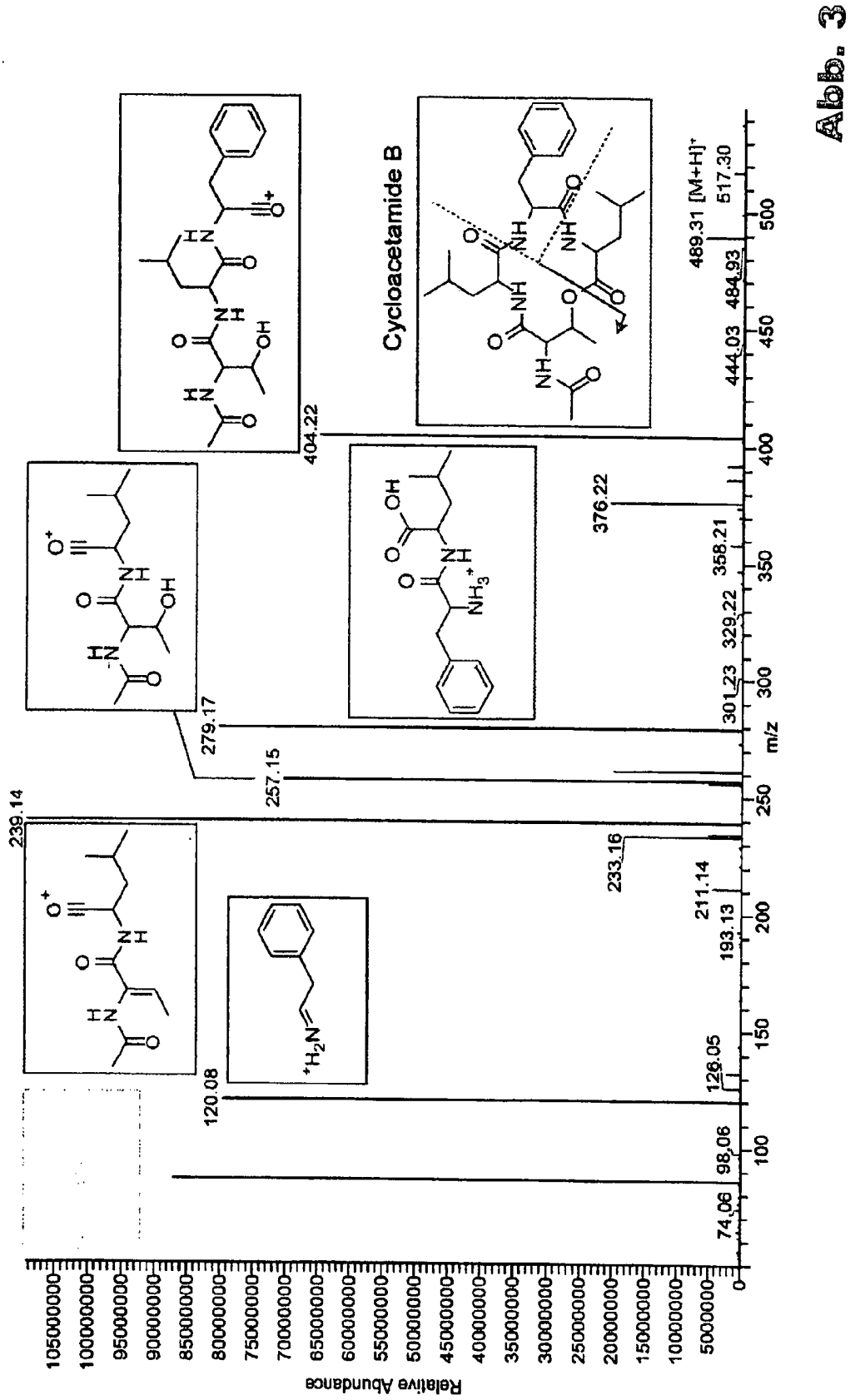

Cycloacetamide B
Relative Abundance
m/z
74.06
98.06
120.08
126.05
193.13
211.14
233.16
239.14
257.15
279.17
301.23
329.22
358.21
376.22
404.22
444.03
469.31 [M+H]+
484.93
517.30

Abb. 3

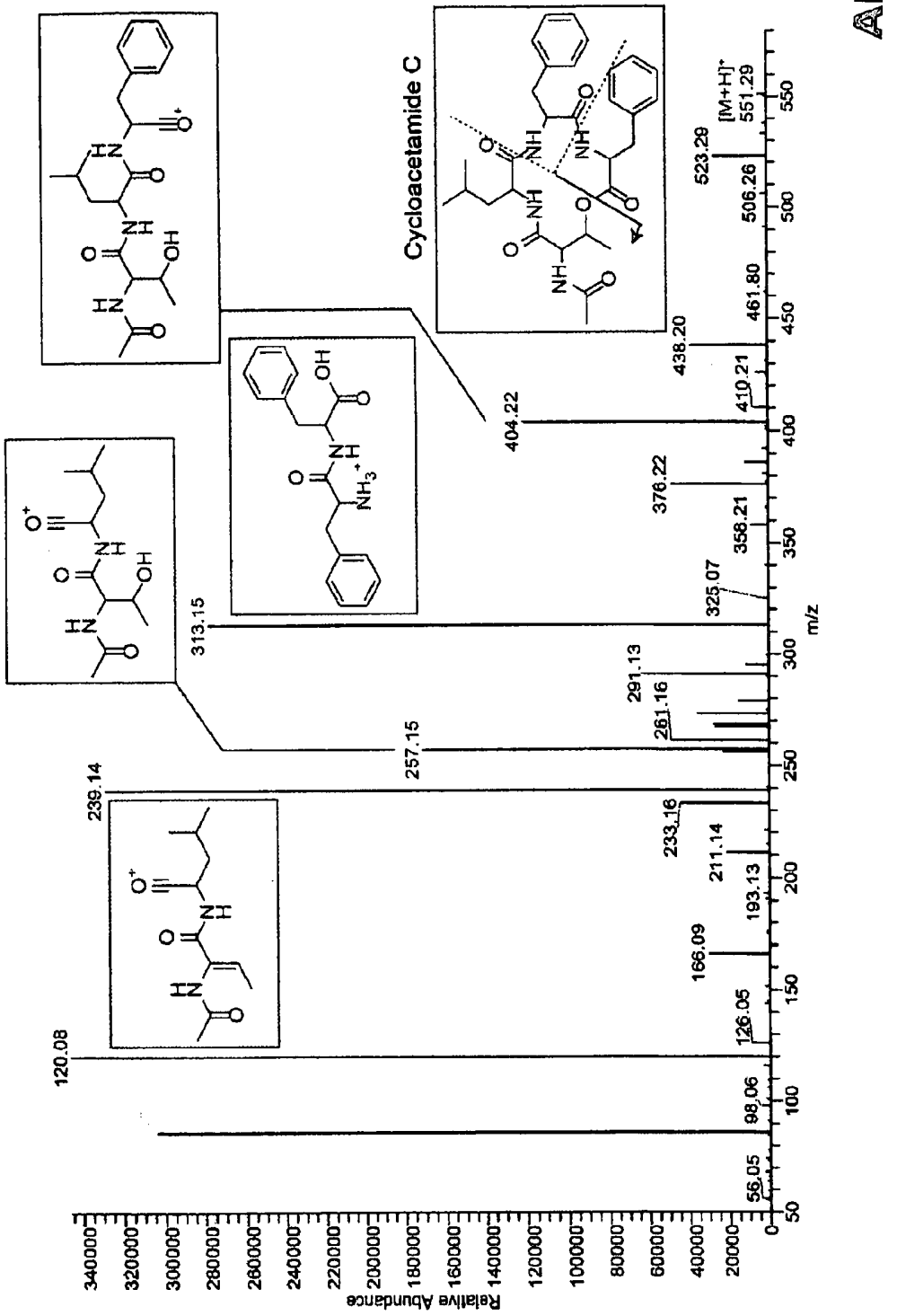

Cycloacetamide C
Relative Abundance
m/z
120.08
239.14
257.15
313.15
404.22
438.20
[M+H]+
551.29

Abb. 4

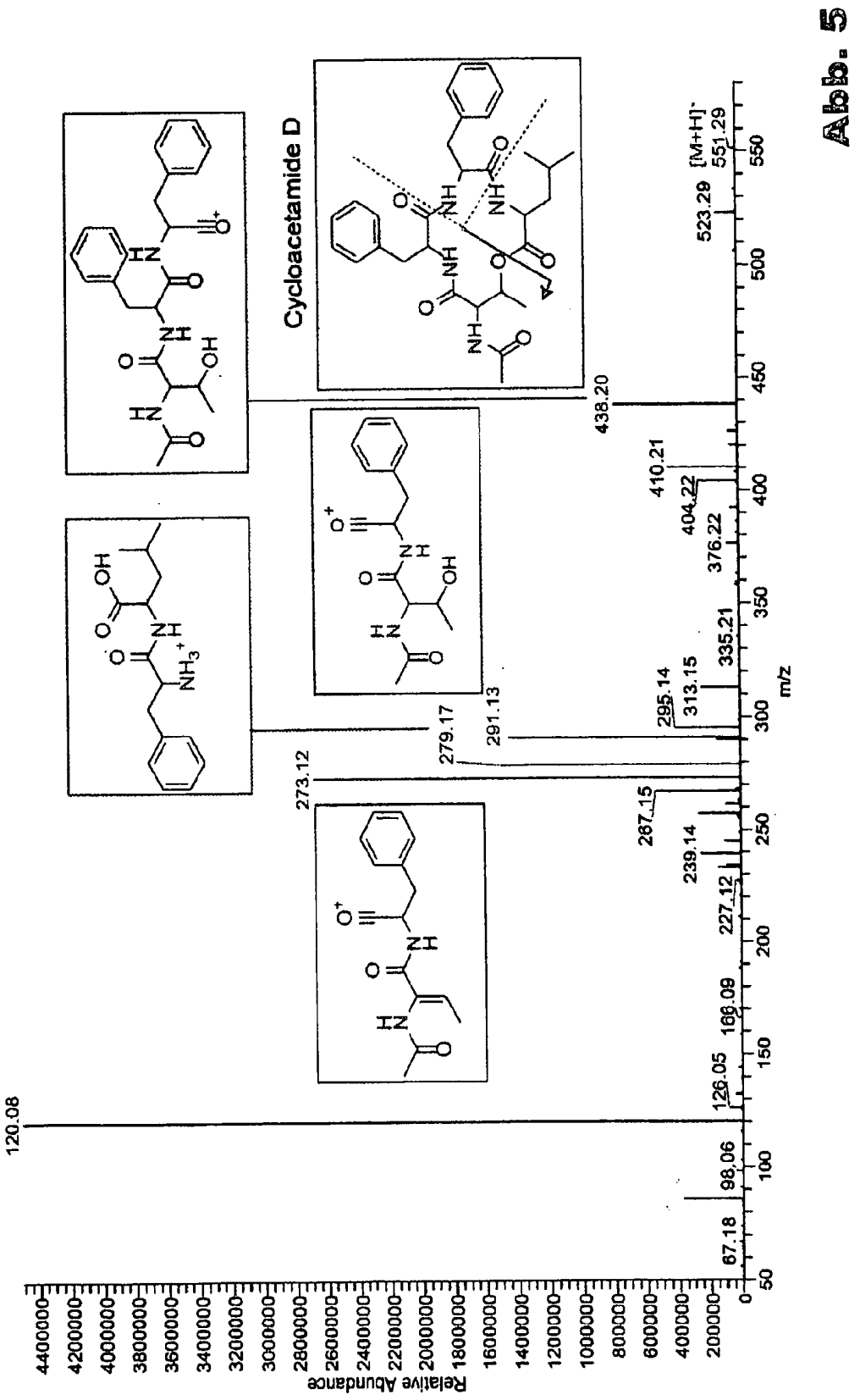

Cycloacetamide D
Relative Abundance
m/z
[M+H]+
551.29
523.29
438.20
410.21
404.22
376.22
335.21
313.15
295.14
291.13
279.17
273.12
267.15
239.14
227.12
166.09
126.05
120.08
98.06
67.18

Abb. 5

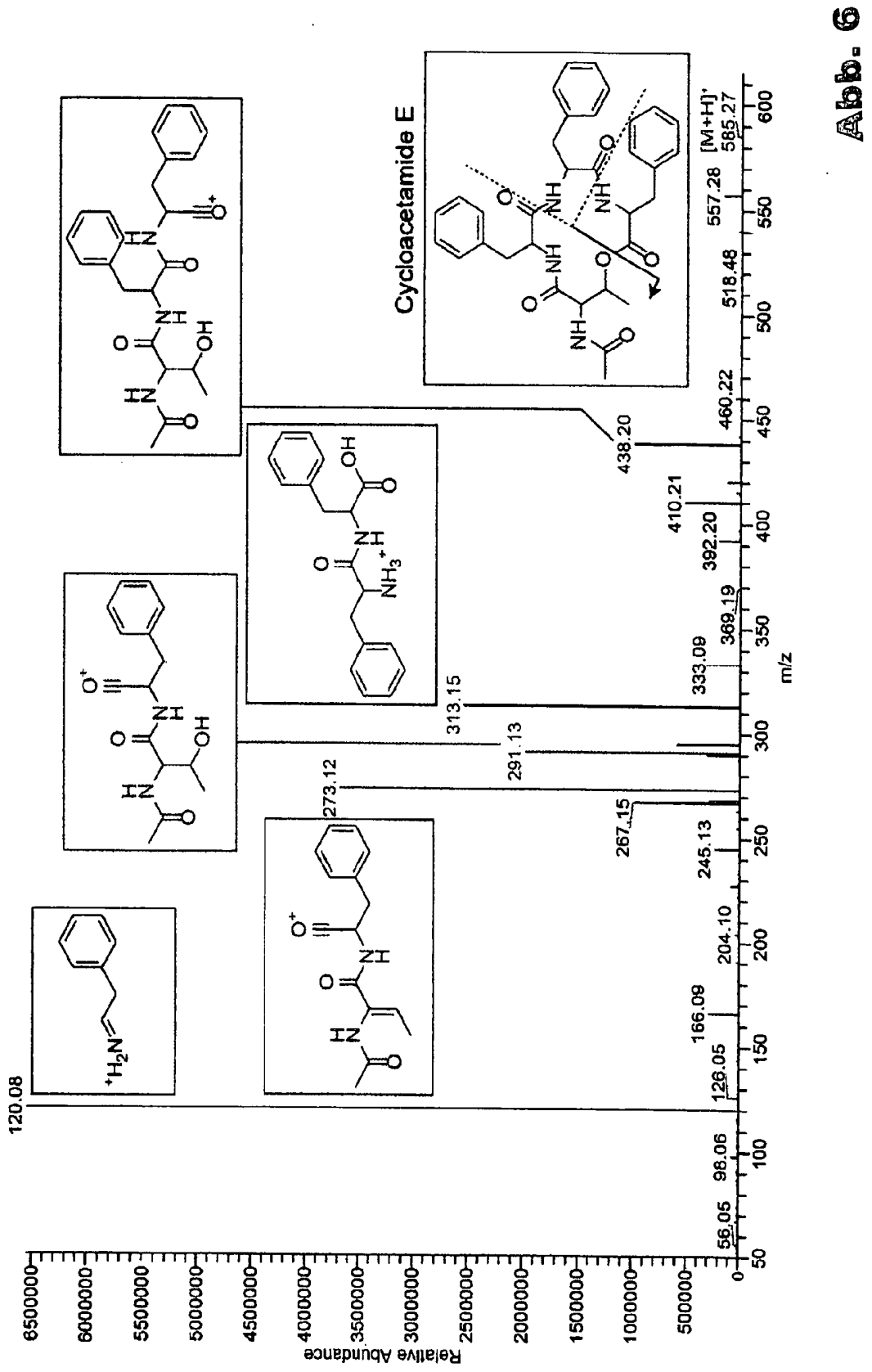

Cycloacetamide E
Relative Abundance
m/z
120.08
56.05
98.06
126.05
166.09
204.10
245.13
267.15
273.12
291.13
313.15
333.09
369.19
392.20
410.21
438.20
460.22
518.48
557.28
[M+H]+
585.27

Abb. 6

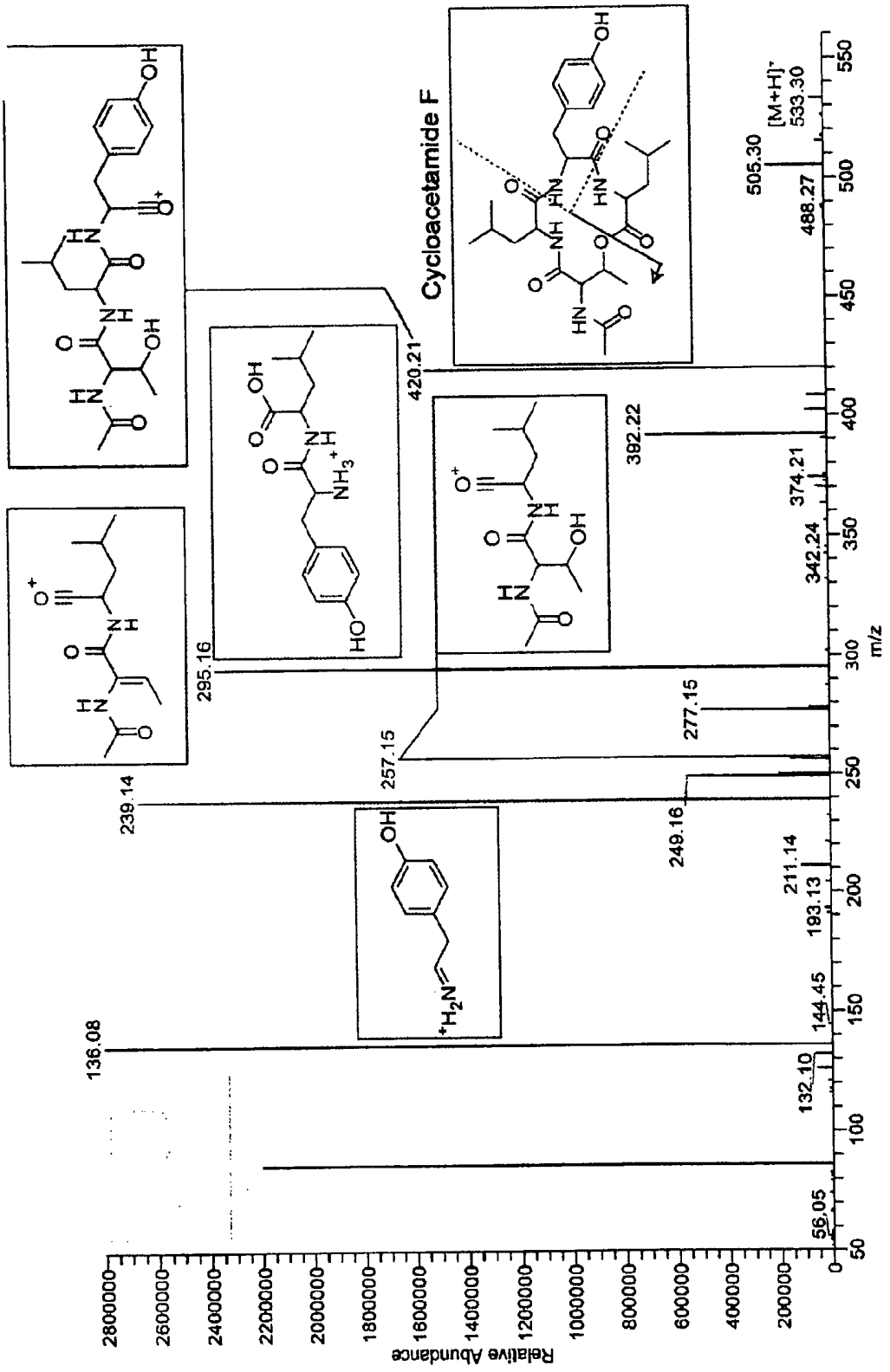

Cycloacetamide F
Relative Abundance
m/z
56.05
132.10
136.08
144.45
193.13
211.14
239.14
249.16
257.15
277.15
295.16
342.24
374.21
392.22
420.21
488.27
505.30
[M+H]+
533.30

Abb. 7

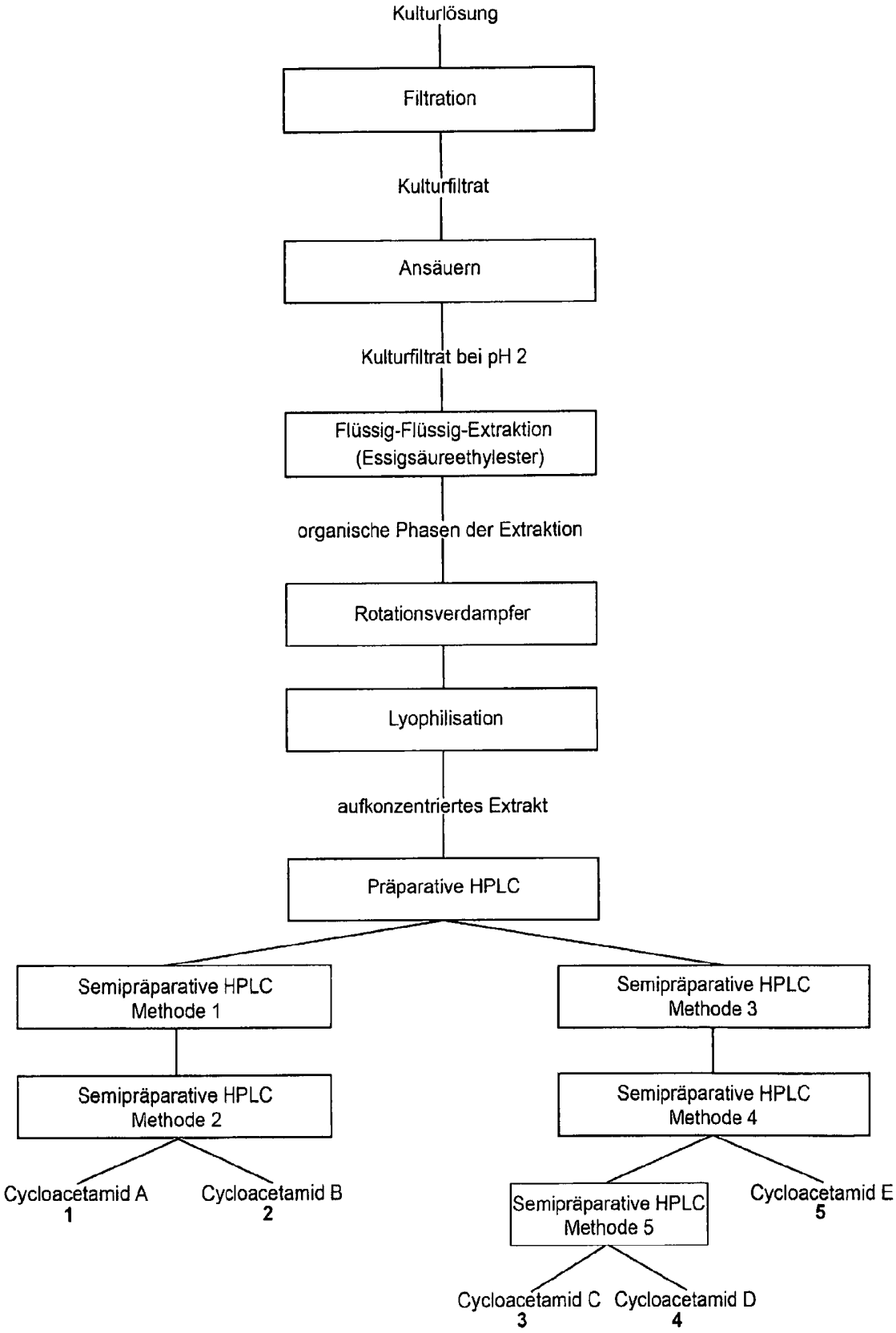

Kulturlösung
Filtration
Kulturfiltrat
Ansäuern
Kulturfiltrat bei pH 2
Flüssig-Flüssig-Extraktion
(Essigsäureethylester)
organische Phasen der Extraktion
Rotationsverdampfer
Lyophilisation
aufkonzentriertes Extrakt
Präparative HPLC
Semipräparative HPLC
Methode 1
Semipräparative HPLC
Methode 2
Cycloacetamid 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

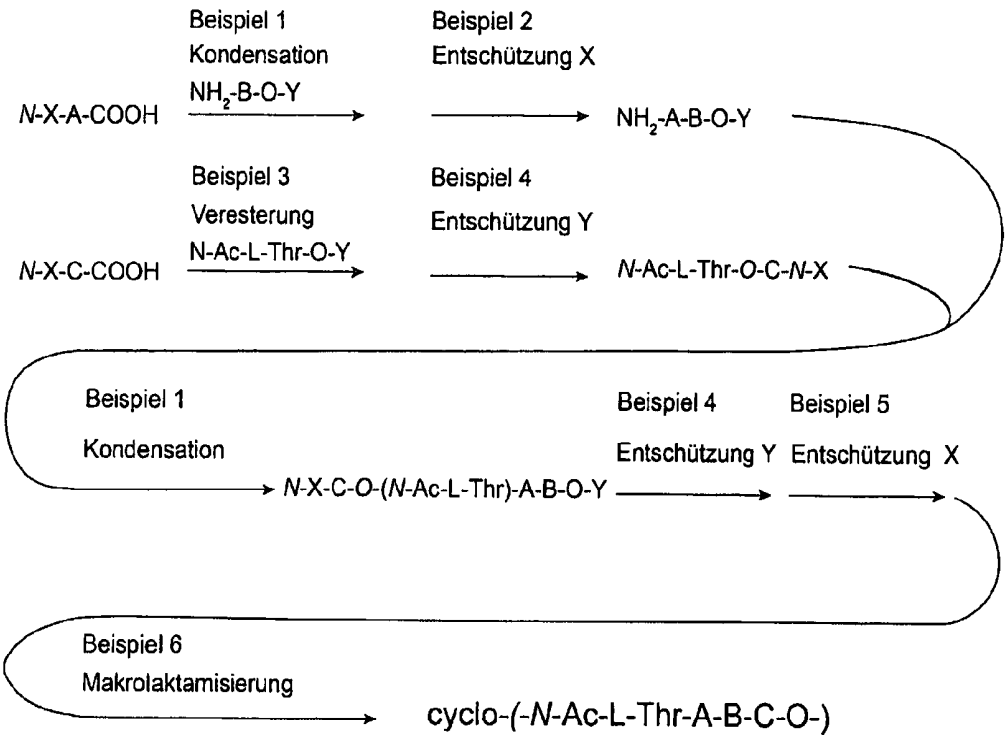

Beispiel 1
Kondensation
NH2-B-O-Y
N-X-A-COOH
Beispiel 2
Entschützung X
NH2-A-B-O-Y
Beispiel 3
Veresterung
N-Ac-L-Thr-O-Y
N-X-C-COOH
Beispiel 4
Entschützung Y
N-Ac-L-Thr-O-C-N-X
Beispiel 1
Kondensation
N-X-C-O-(N-Ac-L-Thr)-A-B-O-Y
Beispiel 4
Entschützung Y
Beispiel 5
Entschützung X
Beispiel 6
Makrolaktamisierung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

Abb. 9

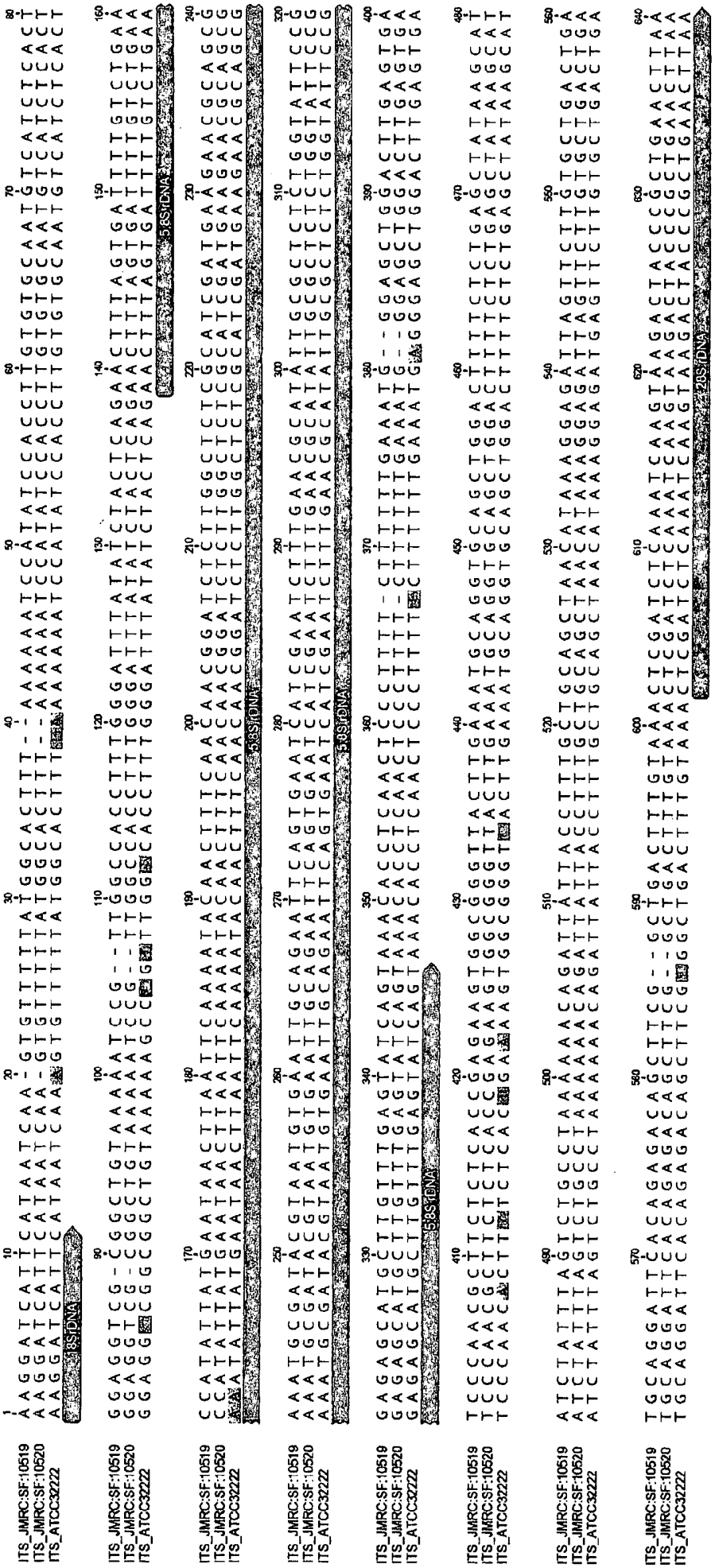

ITS_JMRC:SF:10519
ITS_JMRC:SF:10520
ITS_ATCC32222
18S rDNA
5.8S rDNA
28S rDNA

Abb. 10

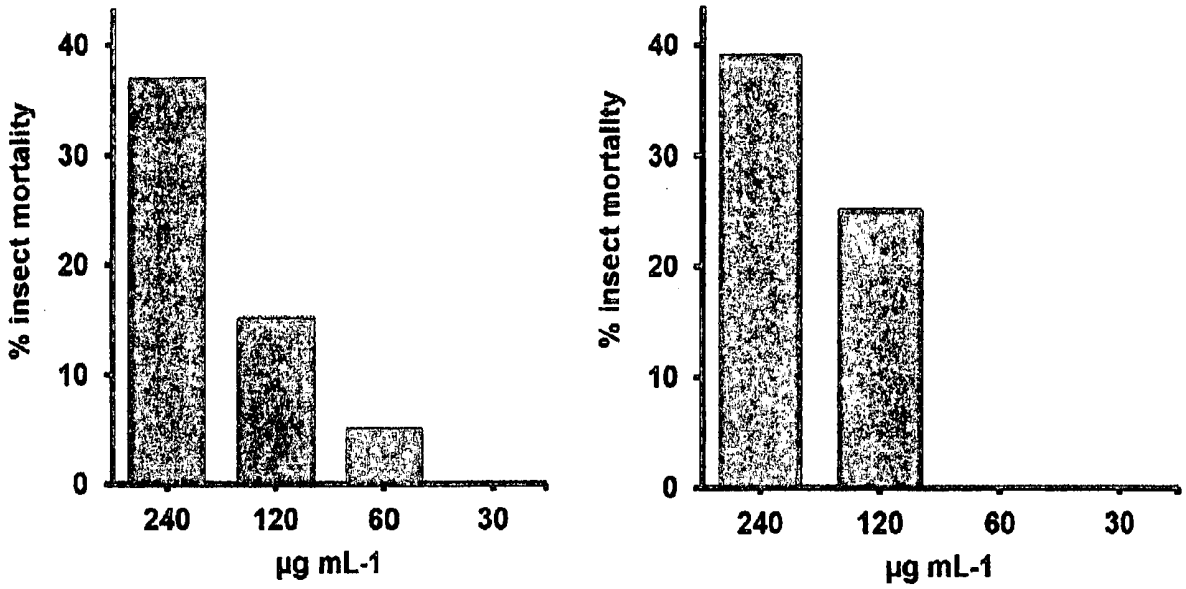
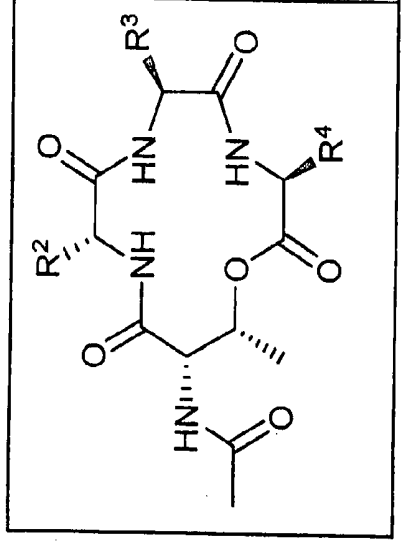

% insect mortality
40
30
20
10
0
240
120
60
30
µg mL-1
% insect mortality
40
30
20
10
0
240
120
60
30
µg mL-1

Abb. 11



#	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 1

	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*
		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 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

ERSATZBLATT (REGEL 26)

	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-Phenylalanin				
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
			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 3

	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-Phenylalanin				
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, 21
16	138.17	C (ar)			
17,21	130.05	CH (ar)	7.25*, m		17, 19, 21
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 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4	Methode 5
HPLC-System ®	Präparative HPLC Agilent 1260	Präparative HPLC Agilent 1260	Präparative HPLC Agilent 1260	Präparative HPLC Agilent 1260	Präparative HPLC 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 %, 0.5-13.5 min: 35-80 %, 13.5-17 min: 80-100 %, 17-19 min: 100 %, 19-19.5 min: 100-35 %, 19.5-21 min: 35 %	0-0.5 min: 45 %, 0.5-10 min: 45-100 %, 10-11 min: 100 %, 11-11.5 min: 100-45 %, 11.5-13 min: 45 %	0-0.5 min: 35 %, 0.5-12.5 min: 35-80 %, 12.5-16 min: 80-100 %, 16-17 min: 100 %, 17-17.5 min: 100-35 %, 17.5-19 min: 35 min	0-0.5 min: 70 %, 0.5-6 min: 70-85 %, 6-13.5 min: 85-100 %, 13.5-14.5 min: 100 %, 14.5-15 min: 100-70 %, 15-16.5 min: 70 %	0-0.5 min: 80 %, 0.5-10.5 min: 80-100 %, 10.5-16.0 min: 100 %, 16-16.5 min: 100-80 %, 16.5-21 min: 80%
Temperatur	12 °C	12 °C	12 °C	12 °C	12 °C
Fließ-geschwindigkeit	2 mL/min	2 mL/min	2 mL/min	2 mL/min	3.5 mL/min
Säule	Agilent Eclipse XDB-C18	Thermo Fisher Hypercarb	Agilent Eclipse XDB-C18	Phenomenex SynergiHydro-RP	Thermo Fisher Hypercarb
Säulenmaße	250 x 9.4 mm, 5 µm	150 x 4.6 mm, 5µm	250 x 9.4 mm, 5 µm	250 x 10 mm, 4 µm	150 x 4.6 mm, 5 µm

Tabelle 5

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}

Tabelle 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE2023/100587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 5/103(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EDGINGTON STEVEN ET AL. "Investigating the insecticidal potential of Geomyces (Myxotrichaceae: Helotiales) and Mortierella (Mortierellacea: Mortierellales) isolated from Antarctica" *SPRINGERPLUS*, DE, Vol. 3, No. 1, 01 December 2014 (2014-12-01), Retrieved from the Internet: https://springerplus.springeropen.com/counter/pdf/10.1186/2193-1801-3-289.pdf DOI: 10.1186/2193-1801-3-289 ISSN: 2193-1801, XP093109520 the whole document	1-10
A	YANG HYUNJUN ET AL. "Design, Synthesis, and Study of Lactam and Ring-Expanded Analogues of Teixobactin" *THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY*, Vol. 85, No. 3, 07 February 2020 (2020-02-07), pages 1331-1339 DOI: 10.1021/acs.joc.9b02631 ISSN: 0022-3263, XP093109447 the whole document	1-10
A	& YANG HYUNJUN ET AL. "Design, Synthesis, and Study of Lactam and Ring-Expanded Analogues of Teixobactin (Supplementary Information)" *THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY*, Vol. 85, No. 3, 07 February 2020 (2020-02-07), pages 1331-1339	1-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 December 2023	**20 December 2023**

Name and mailing address of the ISA/EP	Authorized officer
European Patent Office **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands**	**Schleifenbaum, A**
Telephone No. **(+31-70)340-2040**	
Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	DOI: 10.1021/acs.joc.9b02631 ISSN: 0022-3263, XP093109473 S22, figure S33	
A	GIRT GEORGINA C. ET AL. "Lipopeptidomimetics derived from teixobactin have potent antibacterial activity against Staphylococcus aureus" *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, UK, Vol. 54, No. 22, 13 March 2018 (2018-03-13), pages 2767-2770 DOI: 10.1039/C7CC06093A ISSN: 1359-7345, XP093109451 compounds 15-17	1-10
A	& GIRT GEORGINA C ET AL. "Lipopeptidomimetics derived from teixobactin have potent antibacterial activity against Staphylococcus aureus (Supplementary Information)" *CHEMICAL COMMUNICATIONS*, UK, Vol. 64, No. 22, 13 March 2018 (2018-03-13), pages 2767-2770, Retrieved from the Internet: https://www.rsc.org/suppdata/c7/cc/c7cc06093a/c7cc06093a1.pdf DOI: 10.1039/C7CC06093A ISSN: 1359-7345, XP093109498 compounds 15-17	1-10
X	Anonymous. "Jena Microbial Resource Collection (JMRC) - Strain Catalogue" 11 June 2015 (2015-06-11), pages 1-1052, Retrieved from the Internet: https://www.mikrobiologie.uni-jena.de/imbmedia/institut-voigt/wfccexp-20140814.pdf [retrieved on 2023-12-06] XP093109573 ID 38744 (JMRC:SF:10519)	11
X,P	RASSBACH JOHANNES ET AL. "Insecticidal Cyclodepsitetrapeptides from Mortierella alpina" *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, US, Vol. 86, No. 7, 28 July 2023 (2023-07-28), pages 1715-1722, Retrieved from the Internet: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jnatprod.3c00146 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.3c00146 ISSN: 0163-3864, XP093109417 the whole document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE2023/100587

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☐ forming part of the international application as filed:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2023/100587

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz,** die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

   a) [X] im Anmeldezeitpunkt Bestandteil der internationalen Anmeldung war.

   b) [ ] nach dem internationalen Anmeldedatum nur für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht wurde (Regel 13*ter*.1.a)),

      [ ] zusammen mit einer Erklärung, wonach das Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht.

2. [ ] Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist dieser Bericht insoweit erstellt worden, als eine sinnvolle Recherche auch ohne ein dem WIPO-Standard ST.26 entsprechendes Sequenzprotokoll durchgeführt werden konnte.

3. Zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2023/100587

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07K5/103
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EDGINGTON STEVEN ET AL: "Investigating the insecticidal potential of Geomyces (Myxotrichaceae: Helotiales) and Mortierella (Mortierellacea: Mortierellales) isolated from Antarctica", SPRINGERPLUS, Bd. 3, Nr. 1, 1. Dezember 2014 (2014-12-01), XP93109520, DE ISSN: 2193-1801, DOI: 10.1186/2193-1801-3-289 Gefunden im Internet: URL:https://springerplus.springeropen.com/counter/pdf/10.1186/2193-1801-3-289.pdf> das ganze Dokument ----- -/--	1-10

[x] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [ ] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung;; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
6. Dezember 2023	20/12/2023

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Schleifenbaum, A

1

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	YANG HYUNJUN ET AL: "Design, Synthesis, and Study of Lactam and Ring-Expanded Analogues of Teixobactin", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd. 85, Nr. 3, 7. Februar 2020 (2020-02-07), Seiten 1331-1339, XP93109447, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/acs.joc.9b02631 das ganze Dokument	1-10
A	-& YANG HYUNJUN ET AL: "Design, Synthesis, and Study of Lactam and Ring-Expanded Analogues of Teixobactin (Supplementary Information)", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd. 85, Nr. 3, 7. Februar 2020 (2020-02-07), Seiten 1331-1339, XP93109473, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/acs.joc.9b02631 S22, Abbildung S33	1-10

A	GIRT GEORGINA C. ET AL: "Lipopeptidomimetics derived from teixobactin have potent antibacterial activity against Staphylococcus aureus", CHEMICAL COMMUNICATIONS, Bd. 54, Nr. 22, 13. März 2018 (2018-03-13) , Seiten 2767-2770, XP93109451, UK ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/C7CC06093A Verbindungen 15-17	1-10
A	-& GIRT GEORGINA C ET AL: "Lipopeptidomimetics derived from teixobactin have potent antibacterial activity against Staphylococcus aureus (Supplementary Information)", CHEMICAL COMMUNICATIONS, Bd. 64, Nr. 22, 13. März 2018 (2018-03-13) , Seiten 2767-2770, XP93109498, UK ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/C7CC06093A Gefunden im Internet: URL:https://www.rsc.org/suppdata/c7/cc/c7cc06093a/c7cc06093a1.pdf> Verbindungen 15-17	1-10

	-/--	

1

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Anonymous: "Jena Microbial Resource Collection (JMRC) - Strain Catalogue", , 11. Juni 2015 (2015-06-11), Seiten 1-1052, XP093109573, Gefunden im Internet: URL:https://www.mikrobiologie.uni-jena.de/imbmedia/institut-voigt/wfccexp-20140814.pdf [gefunden am 2023-12-06] ID 38744 (JMRC:SF:10519) -----	11
X,P	RASSBACH JOHANNES ET AL: "Insecticidal Cyclodepsitetrapeptides from Mortierella alpina", JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, Bd. 86, Nr. 7, 28. Juli 2023 (2023-07-28), Seiten 1715-1722, XP93109417, US ISSN: 0163-3864, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.3c00146 Gefunden im Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jnatprod.3c00146> das ganze Dokument -----	1-11

1