

- [198] P. Bissig, H. Greuter, L. Gsell, Eur. Pat. 7446 (1980) und 4316 (1979), Ciba-Geigy.
- [199] M. Elliott, N. F. Janes, D. A. Pulman, US-Pat. 3922269 (1975), NRDC.
- [200] a) M. Elliott, A. W. Farnham, N. F. Janes, P. H. Needham, D. A. Pulman, Pestic. Sci. 1976, 492; b) S. A. Roman, S. B. Soloway, Eur. Pat. 5882 (1979), Shell Int. Res.
- [201] a) R. J. G. Searle, R. E. Woodall, DOS 2407024 (1974), Shell Int. Res.; b) T. Sugiyama, A. Kobayashi, K. Yamashita, Agric. Biol. Chem. 39, 1483 (1975).
- [202] M. Matsui, T. Kitahara, Agric. Biol. Chem. 31, 1143 (1967).
- [203] Y. Katsuta, Y. Minamide, Jap. Kokai Tokkyo Koho 79, 132, 554 (1979); Chem. Abstr. 92, 197997j (1980).
- [204] a) K. Tsushima, N. Kasamatsu, N. Ono, T. Matsuo, M. Mizutani, Jap. Kokai Tokkyo Koho 80, 38341 (1980), Sumitomo Chem. Co. Ltd.; Chem. Abstr. 93, 167731w (1980); b) R. J. G. Searle, R. E. Woodall, M. J. Bull, DOS 2422977 (1974), Shell Int. Res.; c) F. Karrer, S. Faroog, DOS 2732811 (1978), Ciba Geigy; d) T. Kitahara, K. Fugimoto, M. Matsui, Agric. Biol. Chem. 38, 1511 (1974).
- [205] R. A. Fuchs, I. Hammann, W. Stendel, DOS 2825314 (1979).
- [206] a) E. V. Dehmlow, Justus Liebigs Ann. Chem. 758, 148 (1972); b) E. V. Dehmlow, G. Höfle, Chem. Ber. 107, 2760 (1974).
- [207] a) R. W. Addor, M. S. Schrider, DOS 2605828 (1976), Am. Cyanamid Co.; b) S. Faroog, J. Drabek, L. Gsell, F. Karrer, W. Meyer, DOS 2642814 (1977), 2642850 (1977) und 2642861 (1977), alle Ciba-Geigy;
- c) M. S. Schrider, US-Pat. 4078080 (1978); d) D. G. Brown, US-Pat. 4203918 (1980), beide Am. Cyanamid Co.; e) I. Ohno, H. Takeda, M. Hirano, T. Umemura, T. Nishioka, N. Haya, T. Matsuo, Jap. Kokai 76, 148024 (1976), Sumitomo Chem. Co. Ltd.; Chem. Abstr. 86, 166407P (1977); f) S. Faroog, J. Drabek, L. Gsell, O. Kristiansen, W. Meyer, DOS 2723236 (1977) und 2727909 (1978), beide Ciba-Geigy.
- [208] W. W. Brand, DOS 2724734 (1977), Am. Cyanamid Co.
- [209] H. Staudinger, L. Ruzicka, Helv. Chim. Acta 7, 393, 405 (1924).
- [210] a) J. Drabek, S. Faroog, L. Gsell, O. Kristiansen, W. Meyer, DOS 2750182 (1978), Ciba-Geigy; b) P. Winternitz, DOS 2800073 (1978), Hoffmann-La Roche; c) F. Mori, Y. Omura, DOS 2810031 (1978), Kuraray Co. Ltd.
- [211] a) N. Ohno, K. Fujimoto, Y. Okuno, T. Mizutani, M. Hirano, N. Itaya, T. Honda, H. Yoshioka, Agric. Biol. Chem. 38, 881 (1974); b) K. Fujimoto, N. Ohno, T. Mizutani, I. Ohno, M. Hirano, N. Itaya, T. Matsuo, DOS 2335347, DOS 2365555 (1974), beide Sumitomo Chem. Co.
- [212] a) P. A. Verbrugge, E. W. Urbanus, P. A. Kramer, W. Terlouw, DOS 2630633 (1977), Shell Int. Res.; b) N. Ohno, I. Ohno, T. Nishioka, H. Takeda, K. Kasamatsu, DOS 2647366 (1977), Sumitomo Chem. Co.; c) M. Elliott, N. F. Janes, D. A. Pulman, DOS 2717414 (1977), NRDC.
- [213] S. Faroog, J. Drabek, L. Gsell, W. Meyer, F. Karrer, DOS 2647368 (1977), Ciba-Geigy.
- [214] H. D. Scharf, J. Janus, E. Müller, Tetrahedron 35, 25 (1979).
- [215] H. Greuter, D. Bellus, DOS 2747616 (1968), Ciba-Geigy.

## Chemie und Biochemie mikrobieller $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren

Von Ernst Truscheit, Werner Frommer, Bodo Junge, Lutz Müller,  
Delf D. Schmidt und Winfried Wingender<sup>[\*]</sup>

Professor Herbert Grünwald zum 60. Geburtstag gewidmet

$\alpha$ -Glucosidasen gehören zu den wichtigsten Kohlenhydrat-abbauenden Enzymen. Sie katalysieren die Hydrolyse  $\alpha$ -glucosidischer Bindungen; ihre Substrate sind – je nach Spezifität – Oligo- und Polysaccharide. Mikrobielle Inhibitoren von  $\alpha$ -Amylasen und anderen intestinalen Kohlenhydrat-abbauenden Enzymen von Säugetieren sind bei der Behandlung von Stoffwechselkrankungen wie Diabetes mellitus von Interesse. Darüber hinaus erweitern sie das an strukturellen Variationen überaus reiche Spektrum der mikrobiellen sekundären Metaboliten, und sie tragen dazu bei, den Wirkungsmechanismus von  $\alpha$ -Glucosidasen besser zu verstehen. Diese Inhibitoren gehören verschiedenen Substanzklassen an. Bisher am besten untersucht sind mikrobielle  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren, die Glieder einer homologen Reihe von Pseudooligosacchariden (4) sind. Ihnen gemeinsam ist ein für die Hemmwirkung essentielles Kernstück („core“), ein Pseudodisaccharidrest, der aus einer ungesättigten Cyclitol-Einheit und einer 4-Amino-4,6-didesoxy-glucose-Einheit besteht. Die in vieler Hinsicht interessanteste Verbindung dieser homologen Reihe ist Acarbose (5), ein Pseudotetrasaccharid mit stark ausgeprägter inhibitorischer Wirkung gegenüber intestinalen  $\alpha$ -Glucosidasen wie Saccharase, Maltase und Glucoamylase. Dieser Beitrag gibt einen Überblick über dieses neue, in den letzten zehn Jahren eingehender bearbeitete Gebiet der mikrobiellen  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren.

### 1. Einleitung

Natürliche Enzyminhibitoren, insbesondere Inhibitoren von Hydrolasen, sind in pflanzlichen und tierischen Organismen sowie in Bakterien und Pilzen weit verbreitet und zum Teil schon seit langem bekannt. Ubiquitär vorkommend und bezüglich ihrer Struktur, ihrer Funktion und ihres Wirkungsmechanismus am besten untersucht sind die Proteasen-Inhibitoren<sup>[1–4]</sup>. Bereits gegen Ende des vorigen Jahrhunderts wurde über Arbeiten, die sich mit Proteasen-Inhibitoren des Serums beschäftigten, berichtet<sup>[5,6]</sup>. Die Li-

teratur über natürlich vorkommende  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren reicht bis in die frühen dreißiger Jahre dieses Jahrhunderts zurück. So beschrieben Chrzaszcz und Janicki<sup>[7]</sup> 1933 eine in den Malzen mehrerer Getreidearten – besonders in Buchweizen-Malzen – vorkommende, proteinartige, in Wasser nahezu unlösliche Substanz, die sie wegen ihrer Malz- $\alpha$ -Amylase-inaktivierenden Eigenschaften als „Sistoamylase“ bezeichneten. Später beschrieben Kneen und Sandstedt<sup>[8,9]</sup> wasserlösliche Präparationen mit Protein-Charakter und  $\alpha$ -Amylase inhibierenden Eigenschaften, die sie aus Roggen- und Weizensamen-Mehl erhalten hatten. Es handelte sich um potente Inhibitoren von  $\alpha$ -Amylasen aus menschlichem Speichel und Bakterien. Pankreas-Amylase, z. B. vom Schwein, wurde weniger stark gehemmt. Später wurden auch in anderen Pflanzen, z. B.

[\*] Dr. E. Truscheit, Prof. Dr. W. Frommer, Dr. B. Junge, Dr. L. Müller, Dr. D. D. Schmidt, Dr. W. Wingender  
Chemisch-wissenschaftliches Labor Pharma der Bayer AG  
Postfach 10 1709, D-5600 Wuppertal 1

Bohnensamen<sup>[10-14]</sup> und Kolokasien-Knollen<sup>[15]</sup>, starke  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren gefunden, bei denen es sich um Proteine und Glycoproteine handelt. Seit etwa 1970 werden die pflanzlichen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren, vor allem diejenigen aus Weizen, von mehreren Arbeitsgruppen sehr eingehend untersucht<sup>[16]</sup>. Besondere Extraktions-Verfahren unter Anwendung wäßrig-alkoholischer Lösungen bei niedrigen pH-Werten ergaben, ausgehend von Weizensamen-Mehl oder – vorteilhafter – von Weizenkleber, Präparationen, die sich als potente Inhibitoren sowohl von Speichel- als auch von Pankreas- $\alpha$ -Amylasen erwiesen<sup>[17, 18]</sup>. Die Hemmung von Pankreas-Amylase war mit einer derartigen Präparation auch unter in-vivo-Bedingungen möglich. In Stärke-Belastungsversuchen an Ratten, Hunden und gesunden Probanden konnte gezeigt werden, daß der oral applizierte Inhibitor die aus der Stärkebelastung resultierende postprandiale Hyperglykämie<sup>[\*]</sup> und Hyperinsulinämie dosisabhängig reduziert<sup>[17, 19]</sup>. Damit konnte ein neues, von *Puls*<sup>[19, 20]</sup> entwickeltes Konzept für die Therapie von Stoffwechselkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperlipoproteinämie, Typ IV experimentell erhärtet werden. Ein aufgrund dieser Ergebnisse eingeleitetes Screening von mikrobiellen  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren führte zu neuen Wirkstoffen aus Mikroorganismen der Ordnung *Actinomycetales*<sup>[21]</sup>, die verschiedenen Stoffklassen angehören. Unter anderem wurden  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren gefunden, die sich als Glieder einer homologen Reihe komplexer Oligosaccharide (Pseudoooligosaccharide) erwiesen<sup>[22, 23]</sup>.

Die weite Verbreitung mikrobieller  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren, vor allem bei Streptomyzeten wurde in den letzten Jahren von mehreren Arbeitskreisen bestätigt (vgl. Tabelle 4). Damit hat sich gezeigt, daß neue Suchtests im mikrobiologischen Screening zu neuen Substanzklassen mit interessanten biochemischen Wirkungen führen; das an strukturellen Variationen so reiche Spektrum der mikrobiellen sekundären Metaboliten mit bisher vorwiegend antibiotischen Wirkungen erhält hierdurch neue Varianten. Ähnliche Ergebnisse resultieren aus systematischen Untersuchungen, die seit etwa der zweiten Hälfte der sechziger Jahre im Arbeitskreis von *Umezawa*<sup>[24]</sup> durchgeführt werden; es wurden vor allem mikrobielle Inhibitoren von Proteasen, Esterasen, Aminopeptidasen und Enzymen der Adrenalin-Biosynthese gefunden<sup>[24-26]</sup>.

$\alpha$ -Glucosidasen sind ubiquitär in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vorkommende Hydrolasen. Definitionsgemäß katalysieren sie die Hydrolyse  $\alpha$ -glucosidischer Bindungen. Je nach Spezifität sind ihre Substrate Oligo- und Polysaccharide.

Zur Zeit gibt es fast keinen Hinweis auf eine mögliche biologische Funktion der in diesem Beitrag behandelten mikrobiellen  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren. Sie sind einerseits von pharmazeutischem Interesse, andererseits liefern sie einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Wirkungsmechanismus von  $\alpha$ -Glucosidasen. Diese Inhibitoren wurden bisher überwiegend im Hinblick auf ihre Wirkung auf solche  $\alpha$ -Glucosidasen untersucht, die im Intestinaltrakt von Säugetieren vorkommen. Im Pankreas (Bauchspeicheldrüse) gebildete und in den Dünndarm sezernierte  $\alpha$ -Amy-

lase sowie dünndarmwandständige Oligo- und Disaccharidasen mit Glucoamylase-, Maltase-, Isomaltase- und Saccharase-Spezifität stehen somit als Reaktionspartner mikrobieller  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren im Vordergrund des Interesses.

## 2. Amylasen und enzymatische Stärkehydrolyse

Das natürliche Substrat der Amylasen ist Stärke, deren Struktur, die besonders durch Anwendung enzymatischer Methoden aufgeklärt wurde, und Metabolismus bekannt sind<sup>[27-29]</sup>. Stärke besteht aus einem Gemisch von Amylose und Amylopektin. Molekülausschnitte dieser beiden Bestandteile (im allgemeinen 15–25% Amylose und 75–85% Amylopektin) sind in Abbildung 1 wiedergegeben, und ihre wichtigsten Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Eigenschaften von Stärke-Polysacchariden nach *Manners* [28].

Eigenschaft	Amylose	Amylopektin
Allgemeine Struktur	im wesentlichen unverzweigt	verzweigt
Durchschnittliche Kettenlänge [a]	$\approx 10^3$	20–25
Polymerisationsgrad [a]	$\approx 10^3$	$10^4$ – $10^5$
Abbau zu Maltose [%]		
a) mit $\alpha$ -Amylase	$\approx 100$	$\approx 90$
b) mit $\beta$ -Amylase	$\approx 70$ – $100$	$\approx 55$
c) mit $\beta$ -Amylase nach vorhergehender Behandlung mit einem „debranching enzyme“ [b]	100	$\approx 75$

[a] D-Glucosereste. [b] Hefe-Isoamylase.

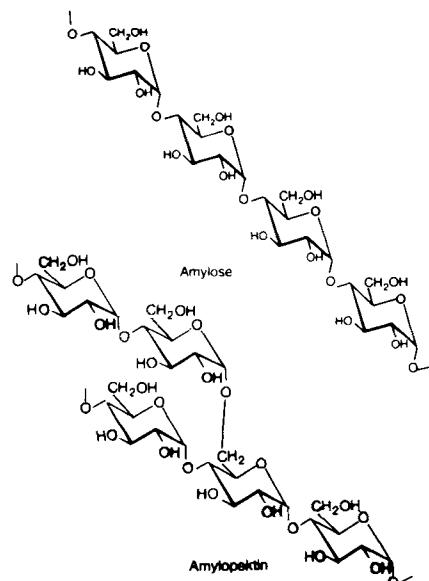


Abb. 1. Molekülausschnitte von Amylose und Amylopektin.

Amylose ist ein lineares (1→4)- $\alpha$ -Glucan, das aus helical angeordneten Polysaccharidketten mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von etwa 1000 Glucoseresten besteht. Amylopektin hingegen ist ein hochverzweigtes Polysaccharid mit einem wesentlich höheren Molekulargewicht (bis zu ca.  $10^7$ ) und einer baumartigen Struktur<sup>[30]</sup>; es besteht aus zwei Arten von (1→4)- $\alpha$ -Glucanketten mit durchschnittlichen Kettenlängen von 20–25 bzw. über 50 Glucoseresten, die über  $\alpha$ (1→6)-Bindungen miteinander verknüpft sind. Insgesamt kann ein Amylopektinmolekül bis zu 100 000 D-Glucosereste und 4000–5000 interchenare

[\*] postprandial = nach dem Essen auftretend; Hyperglykämie = überhöhte Blutglucosewerte; Hyperinsulinämie = überhöhte Blutinsulinwerte; Diabetes mellitus = Zuckerkrankheit; Adipositas = Fettsucht.

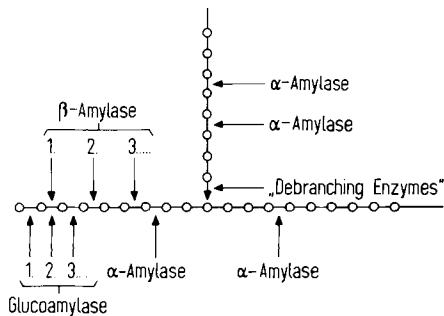
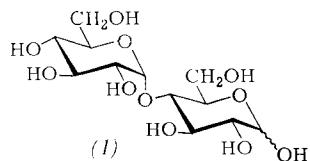


Abb. 2. Angriffsorte Stärke-abbauender Enzyme an einem Ausschnitt des Amylopektinmoleküls.

$\alpha(1 \rightarrow 6)$ -glycosidische Bindungen (und die gleiche Anzahl individueller Ketten) enthalten (Abb. 1 und 2)<sup>[1]</sup>.

$\alpha$ -Amylasen ( $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -D-Glucan-4-glucano-Hydrolasen, EC 3.2.1.1) greifen als „Endoenzyme“ das Substratmolekül – wie in Abbildung 2 für Amylopektin schematisch wiedergegeben – von innen her an und spalten Maltosreste heraus, die dabei in der  $\alpha$ -Konfiguration entstehen. Amylose wird so bis zu 100%, Amylopektin bis zu ca. 90% vorwiegend zu Maltose (1) abgebaut; daneben entstehen in gerin-



gem Umfang unter anderem auch Maltotriose und Glucose. Beim Amylopektinabbau werden außerdem noch sogenannte, in Abbildung 3 schematisch wiedergegebene  $\alpha$ -Dextrine<sup>[28]</sup> gebildet, welche die ursprünglichen interchenaren  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -glycosidischen Bindungen enthalten, die durch  $\alpha$ -Amylasen nicht gespalten werden.

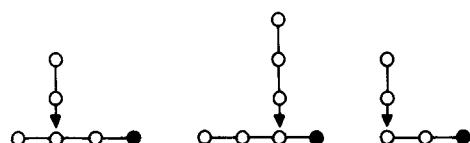


Abb. 3. Typische  $\alpha$ -Dextrin-Strukturen nach Manners [28]. ○:  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -verknüpfter D-Glucosereihe; ↓:  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -interchenare Bindung; ●: freie reduzierende Gruppe.

$\beta$ -Amylasen ( $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -D-Glucan-malto-Hydrolasen, EC 3.2.1.2), die in Pflanzen weit verbreitet sind, vom Säugetierorganismus aber nicht gebildet werden, spalten (als „Exoenzyme“) aus Amylose und Amylopektin vom nicht reduzierenden Ende her (vgl. Abb. 2) sukzessive Maltosereste ab, die durch Inversion in der  $\beta$ -Konfiguration entstehen. Bei der Amylose ist dieser Abbau gelegentlich erst nach Vorbehandlung mit einem „debranching enzyme“ (z. B. mikrobielle Isoamylase, Glycogen-6-glucano-Hydrolase, EC 3.2.1.68) vollständig, bedingt durch die Existenz einiger weniger Verzweigungspunkte im Molekül (vgl. Tabelle 1)<sup>[28]</sup>. Der  $\beta$ -amylolytische Amylopektinabbau bleibt selbst unter diesen Bedingungen unvollständig (vgl. Tabelle 1), da die äußersten Verzweigungsstellen weder gespalten noch umgangen werden können<sup>[27–29]</sup>.

Glucoamylasen ( $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -D-Glucan-gluco-Hydrolasen, EC 3.2.1.3), auch Exo- $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -Glucosidasen, Amyloglucosidasen oder  $\gamma$ -Amylasen genannt, sind vor allem in Mikroorganismen weit verbreitet, kommen aber auch als

[\*] Ein Amylopektinmolekül enthält nur einen reduzierenden Glucoserest.

darmwandständige Enzymkomplexe (siehe Abschnitt 3) im Säugetierorganismus vor. Sie spalten vom nicht reduzierenden Ende her sukzessive Glucosereste ab (Abb. 2).

Die bereits erwähnten „debranching enzymes“, die im nativen Amylopektinmolekül  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -glucosidische Bindungen spalten, kommen vor allem in Mikroorganismen und Pflanzen vor. Entsprechende Enzyme des Säugetierorganismus werden nicht im Intestinaltrakt wirksam. Hier wirken die intestinalen Oligo- und Disaccharidasen (Abschnitt 3) auf  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -glucosidische Bindungen von Amylopektin-Abbauprodukten.

Die  $\alpha$ -Amylasen, die aus mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Quellen erhalten werden können, gehören zu den am besten untersuchten Stärke-abbauenden Enzymen. Die Hauptquellen für tierische  $\alpha$ -Amylasen sind Pankreas-Sekret und Speichel. Es wurden mehrere Formen (Isoenzyme) sowohl menschlicher Speichelamylase<sup>[31]</sup> (MG ≈ 50 000–53 000) als auch von Schweinepankreas-Amylase<sup>[32]</sup> (MG ≈ 51 000–54 000) beschrieben. Hier sind Teilesequenzen der ca. 470 Aminosäurereste enthaltenden Polypeptidkette bekannt.

Zur Aktivitätsbestimmung von  $\alpha$ -Amylasen und deren Inhibitoren werden mehrere Methoden angewendet; zwei davon sind in den Schemata 1 und 2 vorgestellt<sup>[21]</sup>. Die erste, von Bernfeld<sup>[33]</sup> eingeführte Methode wird häufig, wenn auch vielfältig modifiziert, angewendet. Die zweite Methode, der „FIP-Test“, wird von der „Commission on Enzymes“ der Fédération Internationale Pharmaceutique für die Aktivitätsbestimmung von Pankreas- $\alpha$ -Amylase<sup>[34]</sup> empfohlen. Auf weitere Tests, speziell für die Aktivitätsbestimmung pflanzlicher  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren, wurde von Whitaker et al.<sup>[35]</sup> und Marshall et al.<sup>[36]</sup> näher eingegangen.

Prinzip der Bestimmungsmethode nach Bernfeld [33]:

- 1) Hydrolyse löslicher Stärke, 5 min bei 35 °C, pH 6.9 (0.02 M Natrium-glycerophosphat-Puffer, 0.001 M CaCl<sub>2</sub>).
- 2) Bestimmung der gebildeten reduzierenden Gruppen durch Umsetzung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure-Reagens und Messung der Extinktion bei 540 nm.

Definition der Amylase-Einheit (AE):

$$1 \text{ AE} = 1 \mu\text{M} \text{ Maltose/min.}$$

Definition der Amylase-Inhibitor-Einheit (AIE):

1 AIE: Inhibitormenge, die nach 10 min Vorinkubation mit dem Enzym (bei 35 °C, pH 6.9) 2 AE zu 50% hemmt.

Schema 1.  $\alpha$ -Amylase-Aktivität.

Prinzip der Bestimmungsmethode nach F.I.P. [34]; Modifikation des Tests nach Willstätter (R. Willstätter, G. Schudel, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 51, 780 (1918)):

- 1) Hydrolyse löslicher Stärke bei pH 6.8 und 25 °C (in Gegenwart von NaCl).
- 2) Titration der gebildeten reduzierenden Gruppen mit Iod in alkalischer Lösung.

Definition der Amylase-Einheit nach F.I.P. (FIP-AE):

1 FIP-AE: Enzymmenge, die unter den Testbedingungen Stärke mit einer solchen Anfangsgeschwindigkeit spaltet, daß pro min 1 Mikroäquivalent glucosidische Bindungen hydrolysiert wird.

Definition der „F.I.P.-Amylase-Inhibitor-Einheit“ (FIP-AIE):

1 FIP-AIE: Inhibitormenge, die nach Vorinkubation mit dem Enzym 2 FIP-AE zu 50% hemmt.

Schema 2.  $\alpha$ -Amylase-Aktivität.

### 3. Intestinale Oligo- und Disaccharidasen, ihre Substrate und die Bestimmung ihrer Aktivität

Während Pankreas- $\alpha$ -Amylase nach der Nahrungsaufnahme aus der Bauchspeicheldrüse in das Duodenum

(Zwölffingerdarm) abgegeben wird und – von einer teilweisen Adsorption an die Dünndarmwand abgesehen – ihre Wirkung (die Einleitung der intestinalen Stärkeverdauung) in freier Form im Dünndarmlumen entfaltet, sind die intestinalen Oligo- und Disaccharidasen feste Bestandteile der Zellmembran des „Bürstensaums“ („brush border region“) der Dünndarmwand. Diese darmwandständigen Glycosid-Hydrolasen, die nur zu einem geringen Teil in das Darmlumen abgegeben werden, wirken ganz überwiegend in membrangebundener Form. Ihre Eigenschaften und ihre Wirkungsweise sowie der molekulare Wirkungsmechanismus der Saccharase werden in einer Übersicht von Semenza<sup>[37]</sup> eingehend behandelt. Diese Enzyme sind in Tabelle 2 aufgelistet, wobei Trehalase, Lactase und He-

Tabelle 2. Oligo- und Disaccharidasen des Dünndarms [37].

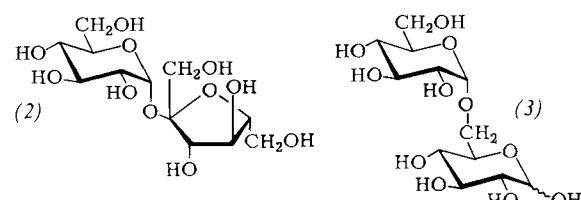
Bezeichnung	EC-Nr.
Maltasen-Glucoamylasen ( $\gamma$ -Amylasen)	3.2.1.20 bzw. 3.2.1.3
Saccharase-Maltase	3.2.1.48 bzw. 3.2.1.20
Isomaltase-Maltase	3.2.1.10 bzw. 3.2.1.20
Grenzdextrinase [40] („ $\alpha$ -limit dextrinase“)	
Trehalase	3.2.1.28
Lactase und Hetero- $\beta$ -glucosidase (Phloridzin-Hydrolase)	3.2.1.23 und 3.2.1.62

tero- $\beta$ -glucosidase hier mehr der Vollständigkeit halber aufgenommen wurden.

Maltasen-Glucoamylasen, auch  $\gamma$ -Amylasen genannt, lassen sich wie die anderen membranständigen Glucosidasen durch Solubilisieren einer Darmschleimhaut-Präparation mit Papain und anschließende Chromatographie in homogener Form gewinnen. Ein Präparat humaner Provenienz ist ein Glycoprotein mit einem Kohlenhydratgehalt von 32–38% und einem Molekulargewicht für den Proteinanteil von ca. 220 000<sup>[38]</sup>. Substrate sind Maltose (1), Maltotriose und höhere  $\alpha$ (1→4)-Glucane bis zu Amylose und Amylopektin (Stärke); es wird vom nicht reduzierenden Ende her abgespalten (vgl. Abb. 2), wobei Glucose in der  $\alpha$ -Pyranoseform entsteht. Die Spaltung verläuft umso rascher, je kleiner das Substratmolekül ist – im Gegensatz zur Spaltung von Poly- und Oligosacchariden durch Pankreas- $\alpha$ -Amylase, die durch Maltose bereits leicht gehemmt wird. Maltasen-Glucoamylasen verbessern also die Effektivität der Pankreas-Amylase. Sie werden durch 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris) kompetitiv inhibiert.

Der Saccharase-Isomaltase-Komplex, der zu den am besten charakterisierten intestinalen Oligo- und Disaccharidasen gehört, kann entweder durch Solubilisieren des Dünndarmmucosa-Materials mit Proteasen (Papain) oder Detergentien (Triton X-100, Natriumdodecylsulfat (SDS)) erhalten werden. Der Komplex ist ein Glycoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 15% und einem Molekulargewicht für den Proteinanteil von ca. 220 000. Durch verschiedene Methoden lässt sich der Komplex in zwei Untereinheiten spalten: eine Saccharase-Maltase und eine Isomaltase-Maltase. Beide Untereinheiten enthalten jeweils ein aktives Zentrum, mit Saccharase- und Maltase-Spezifität bzw. mit Isomaltase- und Maltase-Spezifität. Beim Saccharase-Isomaltase-Komplex aus menschlicher Dünndarmmucosa gelingt die Spaltung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und Harnstoff<sup>[39]</sup>. Die beiden Untereinheiten haben ähnliche Aminosäurezusammensetzungen, und beide

setzen Glucose in der  $\alpha$ -Pyranoseform frei. Die Saccharase-Maltase-Untereinheit spaltet Saccharose (2), Maltose (1), Maltotriose und höhere Oligosaccharide. Substrate für



die Isomaltase-Maltase-Untereinheit sind außer Maltose (1) und Isomaltose (3) auch andere Oligosaccharide mit  $\alpha$ (1→6)-glucosidischen Bindungen wie Isomaltulose, Isomaltotriose,  $\alpha$ -Dextrine (vgl. Abb. 3) und höhere Grenzdextrine. Beide Untereinheiten werden durch Tris kompetitiv gehemmt. Nach Untersuchungen von Marshall et al.<sup>[40]</sup> ist außer der Isomaltase-Maltase noch eine weitere als Grenzdextrinase („limit dextrinase“) bezeichnete  $\alpha$ -Glucosidase der Dünndarmwand zu fordern, die  $\alpha$ (1→6)-glucosidische Bindungen spaltet.

Die Funktion der intestinalen  $\alpha$ -Glucosidasen ist zum einen der weitere Abbau von Oligosacchariden (Maltose, Maltotriose,  $\alpha$ -Dextrine, Isomaltose etc.), die durch Pankreas- $\alpha$ -Amylase aus der mit der Nahrung zugeführten Stärke gebildet werden, bis zur absorbierbaren Glucose, die dann im Intermediärstoffwechsel verwertet wird. Zum anderen liegt ihre Funktion im Abbau von mit der Nahrung zugeführten Oligosacchariden wie Saccharose zu absorbierbaren Monosacchariden wie Glucose und Fructose. In vivo sind diese Vorgänge recht komplex und noch nicht bis ins allerletzte Detail aufgeklärt. Eine kürzlich von Semenza verfaßte Übersicht<sup>[41]</sup> behandelt den letzten Stand der Kenntnisse und offene Fragen auf diesem Gebiet.

Bei der Bestimmung der Aktivität intestinaler Oligo- und Disaccharidasen und deren Inhibitoren werden meist durch Solubilisierung von z. B. Schweinedünndarmmucosa gewonnene Enzympräparationen<sup>[42]</sup> verwendet. Die Spezifität des betreffenden Tests wird durch das Substrat (Saccharose<sup>[23, 43b]</sup>, Maltose<sup>[44]</sup>, Isomaltose<sup>[44]</sup>, lösliche Stärke<sup>[44]</sup>, „Dextrin“ (gewonnen durch erschöpfenden Abbau von Glycogen mit Pankreas-Amylase)<sup>[45, 46]</sup>) gegeben. In Schema 3 ist beispielhaft die Bestimmung der Saccharaseaktivität und deren Hemmung skizziert<sup>[43b]</sup>.

Prinzip der Bestimmungsmethode [43b]:

- 1) Hydrolyse von 0.2 M Saccharose, 20 min bei 37°C, pH 6.25 (0.1 M Natrium-maleinat-Puffer).
- 2) Bestimmung der gebildeten Glucose mit Glucose-Dehydrogenase-Reagens (in 0.5 M Tris-Puffer, pH 7.6), 30 min bei 37°C und Messung der Extinktion bei 340 nm.

Prinzip des Saccharase-Inhibitionstests [43b]:

Bestimmung der Restaktivität nach 10 min Vorinkubation des Enzyms mit dem Inhibitor bei 37°C, pH 6.25.

Schema 3. Saccharase-Aktivität.

#### 4. Vorkommen und Zusammensetzung mikrobieller $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren

Vor etwa zehn Jahren begann man mit der Suche nach mikrobiellen  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren; sehr bald wurden in fast allen Gattungen der Ordnung *Actinomycetales*, von denen zahlreiche Stämme zur Verfügung standen, entsprechende Aktivitäten – vor allem gegen Schweinepankreas- $\alpha$ -Amylase und Schweinedünndarm-Saccharase – gefunden<sup>[21, 25]</sup>. Besonders verbreitet sind die Inhibitoren bei

Stämmen aus der Familie der *Actinoplanaceen*<sup>[\*]</sup>, vor allem der Gattungen *Actinopales*, *Ampullariella* und *Streptosporangium*. Tabelle 3 gibt ausschnitthaft Ergebnisse dieser Tabelle 3. Vorkommen von Amylase- und Saccharase-Inhibitionen bei Stämmen verschiedener Gattungen [25].

Gattung	Anzahl der getesteten Stämme	Zahl der wirksamen Stämme gegen	
		Schweinepankreas-Amylase	Schweinedünndarm-Saccharase
<i>Streptomyces</i>	85	3	2
<i>Actinopales</i>	220	43	24
<i>Streptosporangium</i>	161	18	24

Tabelle 4. Vorkommen und Zusammensetzung mikrobieller Inhibitoren von Säugetier- $\alpha$ -Glucosidasen (nach Publikationsdaten chronologisch geordnet).

Vorkommen	Zusammensetzung	Spezifität	Lit.
Actinomyceten verschiedener Gattungen	Proteine, komplexe Oligosaccharide	Speichel- und Pankreas- $\alpha$ -Amylase, Glucoamylasen, intestinale Oligo- und Disaccharidasen	[21, 23]
<i>Streptomyces flavochromogenes</i>	kohlenhydrathaltige Polypeptide (Inhibitoren A, B, B', C)	Speichel- und Pankreas- $\alpha$ -Amylase, bakterielle $\alpha$ -Amylase, <i>Rhizopus</i> -Glucoamylase	[47-50]
<i>Streptomyces diastaticus var. amylostaticus</i>	N-haltiges Oligosaccharid (Amylostatin, S-AI)	Speichel- und Pankreas- $\alpha$ -Amylase, mikrobielle $\alpha$ -Amylase, Malz- $\alpha$ -Amylase, <i>Rhizopus</i> - $\alpha$ -Amylase	[51-53]
<i>Streptomyces fradiae</i>	saures Polypeptid, MG ≈ 6500 (Inhibitor X 2)	$\alpha$ -Amylase	[54]
Bacillen, Streptomyceten	Nojirimycin, L-Desoxynojirimycin	intestinale Säugetier-Oligo- und Disaccharidasen, $\beta$ -Glucosidasen aus Pflanzen und Pilzen	[44, 55-63]
<i>Streptomyces spec.</i>	glucosehaltiges Oligosaccharid, MG ≈ 600	Speichel- $\alpha$ -Amylase, Glucoamylase	[64]
<i>Streptomyces calidus</i>	Glycopeptid, reich an Lysin und Glucose	$\alpha$ -Amylase, Maltase und Saccharase des Verdauungstraktes	[65]
<i>Streptomyces tendae</i>	Polypeptid, MG ≈ 7400	tierische $\alpha$ -Amylase	[66, 67]
<i>Streptomyces spec.</i>	N-haltige Oligosaccharide (Aminozucker)	$\alpha$ -Amylase, Saccharase, Maltase	[68]
<i>Streptomyces calvus</i>	N-haltige Oligosaccharide, MG ≈ 950-1050, 650-700 (Inhibitoren TAI-A bzw. TAI-B)	mikrobielle und Säugetier- $\alpha$ -Amylase, mikrobielle Glucoamylase	[69]
<i>Streptomyces dimorphogenes</i>	„Aminozucker-Derivate“ (Trestatine A, B, C)	$\alpha$ -Amylase	[70]
<i>Streptomyces griseocephalus</i>	Proteine, MG ≈ 8500 (Inhibitoren Haim I und II)	Pankreas- $\alpha$ -Amylase	[71, 72a]
<i>Streptomyces myxogenes</i>	schwach basische Oligosaccharide (SF-1130-X <sub>1</sub> , -X <sub>2</sub> , -X <sub>3</sub> ) und -Saccharase	intestinale Säugetier- $\alpha$ -Glucosidase	[72b]

[\*] Diese bis dahin wenig auf Sekundärstoffbildung untersuchten Stämme wurden von A. Hessen und D. Schäfer, Fachbereich Botanik der Universität Marburg, isoliert.

Untersuchungen wieder<sup>[25]</sup>. Auffallend ist die relativ große Häufung der Wirkungen bei *Actinopales* und *Streptosporangium*. Manche Stämme zeigten Wirkungen gegen einzelne  $\alpha$ -Glucosidasen, andere waren gegen mehrere wirksam. Die Anreicherung von  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren führte zu zwei Wirkstoffgruppen<sup>[23, 25]</sup>:

a) Inhibitoren mit Polypeptid-Charakter, die hitzelabil so wie schwer oder nicht dialysierbar sind und sich durch Behandlung mit Trypsin, Harnstoff oder  $\beta$ -Mercaptoethanol inaktivieren lassen;

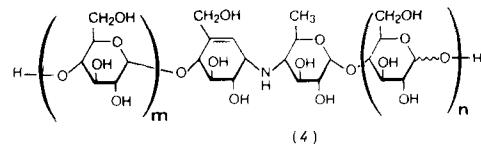
b) Inhibitoren, bei denen es sich um komplexe Oligosaccharide handelt und die besonders eingehend untersucht wurden (siehe Abschnitt 5). Sie sind stabil gegen Hitze (bei pH 7), Säure (bis pH 2), Alkali (bis pH 12) und zum Teil dialysierbar. In dieser Gruppe finden sich außer  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren auch Inhibitoren von Oligo- und Disaccharidasen des Intestinaltraktes von Säugetieren.

Das Vorkommen der  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren, die in den folgenden Abschnitten näher besprochen werden, besonders bei Streptomyceten ist in den letzten Jahren immer wieder bestätigt worden (Tabelle 4).

## 5. Acarbose und homologe pseudooligosaccharidische $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren

Wie in Abschnitt 4 erwähnt, wurde in Kulturfiltraten von Actinomyceten eine neuartige Substanzklasse sekundärer Metabolite mit stark ausgeprägter Hemmwirkung vorwiegend gegenüber intestinalen  $\alpha$ -Glucosidasen von Säugetieren gefunden<sup>[21-23]</sup>. Bei diesen Inhibitoren handelt es sich um Glieder einer homologen Reihe von Pseudooligosacchariden, deren allgemeine Formel (4) in Tabelle 5 wiedergegeben ist.

Tabelle 5. Näher charakterisierte pseudooligosaccharidische  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren der allgemeinen Formel (4).



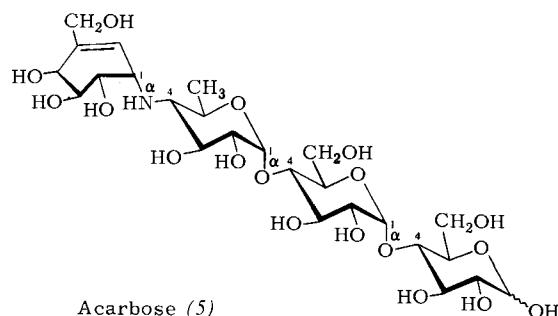
Bezeichnung	m	n	Strukturformel	Lit.
Komponente 2	0	1	(6)	[25, 46]
Komponente 3 (Acarbose, BAY g 5421)	0	2	(5)	[23, 25, 43b, 46]
Komponente 4-Isomer [a]	1	2	(27)	[25, 46]
Komponente 5-Isomer [b]	2	2	(28)	[25, 46]
Komponente 6-Isomer [c]	3	2	(30)	[25, 46]

[a] Hauptanteil des Isomerengemisches mit m+n=3. [b] Hauptanteil des Isomerengemisches mit m+n=4. [c] Hauptanteil des Isomerengemisches mit m+n=5.

Charakteristisch für diese Inhibitoren ist ein für die Hemmwirkung essentielles Kernstück („core“), das aus einer ungesättigten Cyclitol- (Hydroxymethylconduritol-Rest) und einer 4-Amino-4,6-didesoxy-D-glucopyranose-Einheit (4-Amino-4-desoxy-D-chinovose-Rest) aufgebaut ist. Dieses „core“ ist mit einer unterschiedlichen Anzahl von Glucoseresten wie in den natürlichen Substraten (z. B. Amylose, Maltose) der gehemmten  $\alpha$ -Glucosidasen  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -verknüpft. Im Cyclitolteil der Moleküle sind die

Substituenten stereochemisch ähnlich wie in einer  $\alpha$ -D-Glucopyranose-Einheit angeordnet.

Einzelne Glieder dieser homologen Reihe wurden entweder in einheitlicher Form oder als schwer trennbare Isomerengemische isoliert und näher charakterisiert (Tabelle 5). Am eingehendsten untersucht – sowohl im Hinblick auf ihre Mikrobiologie<sup>[25]</sup>, Chemie, Biochemie<sup>[43b, 46, 73]</sup> und Pharmakologie<sup>[45, 74, 100]</sup> als auch bezüglich ihrer medizinisch-klinischen Anwendung<sup>[75, 76]</sup> – wurde Komponente 3 (5). Sie erhielt die Prüfbezeichnung BAY g 5421 und den „generic name“ Acarbose<sup>[45]</sup>.



Derartige pseudooligosaccharidische  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren wurden erstmals in Kulturbrühen des *Actinoplanes*-Stammes SE 50<sup>[\*]</sup> nachgewiesen. Hier wurden sowohl Inhibitoren von  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas als auch von einer Saccharase-Präparation aus Schweinedünndarm-Mucosa gefunden. Die inhibitorische Aktivität der Kulturbrühen gegenüber  $\alpha$ -Amylase oder Saccharase kann in einem weiten Bereich variieren, abhängig von den gewählten Kulturbedingungen<sup>[25]</sup>.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, ist die Zusammensetzung der Kohlenstoffquelle des Nährmediums von entscheidender Bedeutung für die produzierten inhibitorischen Aktivitäten. Glucose und Maltose enthaltende Medien ergeben besonders hohe Titer an Saccharase-Inhibition, während Stärke enthaltende Medien zu höchsten Gehalten an  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren führen<sup>[25]</sup>. Diese Tendenz konnte durch Selektion natürlicher Varianten des Stammes SE 50 verstärkt werden. So produziert der Substamm SE 50/13 in einem Stärke enthaltenden Medium Amylase-Inhibitor-Titer von ca. 35 000 FIP-AIE/mL und nur sehr geringe Saccharase-inhibitorische Aktivitäten. Dagegen produziert der Stamm SE 50/110 in einem Maltose enthaltenden Medium Saccharase-Inhibitor-Titer von ca. 60 SIE/mL, während nur ein Amylase-Inhibitor-Titer von ca. 760 FIP-AIE/mL erreicht wird<sup>[25]</sup>.

Tabelle 6. Kohlenstoff-Ernährung und Inhibitorproduktion des *Actinoplanes*-Stammes SE 50 [25].

Kohlenstoffquelle	Titer nach 4 d		
	SIE/L	AIE/mL	$\frac{\text{SIE}}{\text{AIE}} \times 10^{-3}$
Glycerin 3%	160	100	1.6
Galaktose 3%	1100	100	11
Maltose 3%	5500	1000	5.5
Cellulobiose 3%	1300	220	6
Glycerin 1% + Glucose 2%	2700	120	22
Galactose 1% + Glucose 2%	2700	120	22
Maltose 1% + Glucose 2%	6600	200	33
Cellulobiose 1% + Glucose 2%	2200	105	21

[\*] Dieser Stamm wurde von A. Henssen und D. Schäfer, Fachbereich Botanik der Universität Marburg, isoliert.

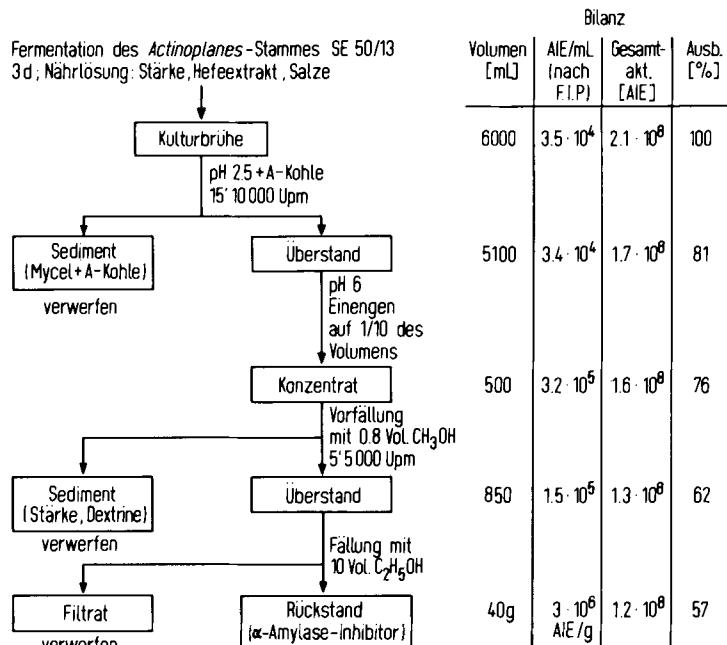


Abb. 4. Mikrobiologische Gewinnung eines  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor-Standardpräparates (BAY e 4609) [21, 85].

Abbildung 4 gibt eine schematische Übersicht über die Gewinnung eines angereicherten Inhibitorgemisches wieder, das vorwiegend aus solchen Gliedern der homologen Reihe der allgemeinen Formel (4) besteht, die  $\alpha$ -Amylase stark inhibieren. Die durch fraktionierende Fällung des Kulturfiltrats mit Methanol und Ethanol erhaltene Präparation hemmt in starkem Maße  $\alpha$ -Amylasen aus menschlichem Speichel und Pankreas sowie aus Schweinepankreas<sup>[25]</sup>. Sie diente unter anderem auch als Standardpräparat für pharmakologische<sup>[45, 77]</sup> und klinische<sup>[78]</sup> Untersuchungen. Ihr Molekulargewichtsbereich ist durch die Fällungsbedingungen (löslich in 50proz.  $\text{CH}_3\text{OH}$ , fällbar aus einem Gemisch von  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$  und  $\text{H}_2\text{O}$ , 84 : 8 : 8) eingegrenzt. Die Analyse der Oligomerenverteilung dieses Gemisches aus hemmaktiven und inertnen Oligosacchariden durch Gelchromatographie an Bio-Gel P-6<sup>[22]</sup> ergab zwei hemmaktive Anteile unterschiedlicher Molekulargewichtsbereiche<sup>[25, 46]</sup>.

Der höhermolekulare Anteil (geschätztes MG 6000–8000) wurde noch nicht näher untersucht. Chromatographie des niedermolekularen Anteils an Bio-Gel P-2 ergab eine hemmaktive Fraktion beim Elutionsvolumen einer Maltononaose (MG = 1477). Dieser Anteil besteht vorwiegend aus einem Isomerengemisch der Komponenten 7 und 8 (vgl. (4),  $m+n=6$  bzw. 7). Daneben sind in geringen Mengen auch die Komponenten 3 bis 6 [(4),  $m+n=2, 3, 4, 5$ ] enthalten<sup>[22]</sup>. Durch Chromatographie dieser Fraktion an stark sauren Ionenaustauschern konnte eine weitgehend von inertnen Kohlenhydraten freie Präparation des Inhibitorgemisches mit einer spezifischen Aktivität von  $15 \cdot 10^6$  FIP-AIE/g erhalten werden. Das bedeutet eine etwa fünfzehnste Steigerung der spezifischen Inhibitoraktivität im Vergleich zum Ausgangsmaterial (BAY e 4609)<sup>[46]</sup>.

Hydrolysiert man das rohe  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren-Gemisch (BAY e 4609) mit 0.5 N Salzsäure bei 100 °C, so ist eine sukzessive Abnahme der  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor-Aktivität zu beobachten, die mit einer entsprechenden Zunahme einer Saccharase-Inhibitor-Aktivität einhergeht<sup>[23, 43b, 80]</sup>. Nach Durchlaufen eines Maximums (ca. 45 min nach Hy-

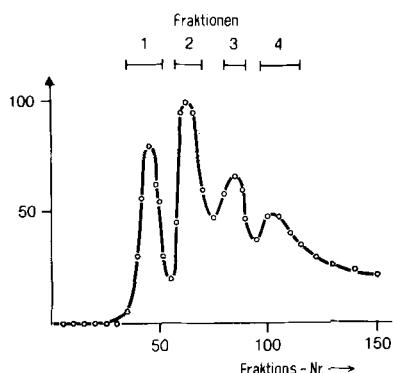


Abb. 5. Verteilungschromatographie (Cellulose) eines Hydrolysates des  $\alpha$ -Amylase-Inhibitorpräparates BAY e 4609 [46]. System: Pyridin/Ethylacetat/Essigsäure/Wasser (36/36/7/21); Säule: 1.6 × 185 cm; Durchlauf: 25 mL/h; Fraktionen à 8 mL. Ordinate: Prozent Saccharase-Hemmung durch 10  $\mu$ L der betreffenden Fraktion.

drolyse-Beginn) erfolgt im weiteren Verlauf auch ein Abfall der Saccharase-Inhibitor-Aktivität bis auf minimale Werte (totale Zersetzung der Inhibitoren). Mit Dünn-schicht- und Hochdruckflüssigkeitschromatographie ließ sich zeigen, daß im Verlaufe der Hydrolyse unter stetig zunehmender Abspaltung von Glucose-Resten die ganze homologe Reihe der inhibitorisch aktiven Komponenten durchlaufen wird<sup>[43b]</sup>. Eine nach 1 h erhaltene Lösung mit hoher Saccharase-hemmender und minimaler  $\alpha$ -Amylase-hemmender Wirkung wurde eingehender untersucht<sup>[46]</sup>. Durch Adsorption an Aktivkohle und fraktionierende Desorption gelang die Abtrennung inhibitorisch aktiver Komponenten von den übrigen Produkten (hauptsächlich Glucose und Maltose). Durch Verteilungschromatographie an Cellulose (vgl. Abb. 5) und nach weiterer Reinigung durch Gel-Chromatographie an Sephadex G-15 konnten vier

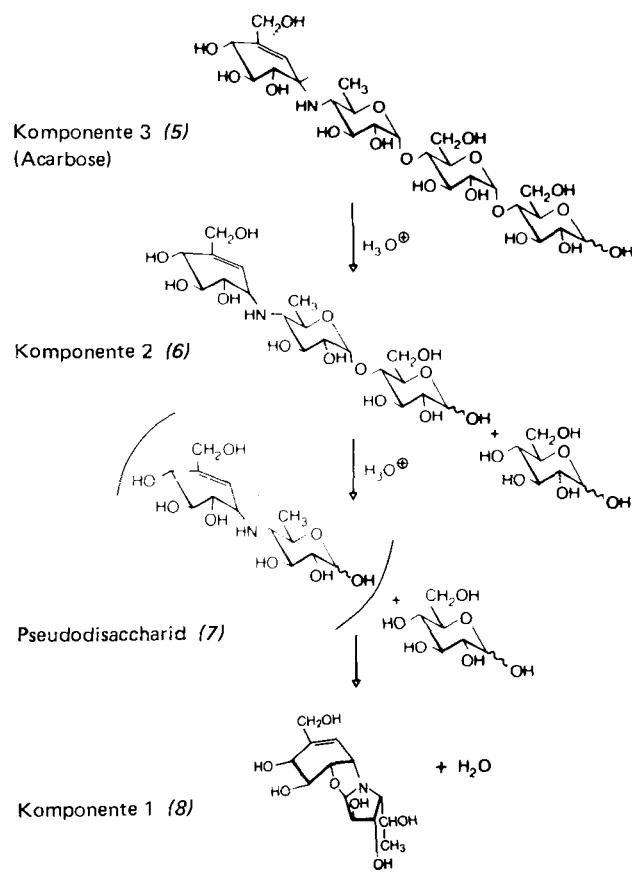


Abb. 6. Saure Hydrolyse der Komponente 3 (5) (Acarbose) [46].

reine Komponenten (1–4: Komponente 1 aus Fraktion 1 der Verteilungschromatographie, Komponente 2 aus Fraktion 2 usw.) mit unterschiedlicher Saccharase-Hemmung, die bei Komponente 1 nur noch sehr schwach ausgeprägt ist, erhalten werden. Durch saure Hydrolyse läßt sich jeweils ein Glucoserest aus den Komponenten 2–4 abspalten; dabei entsteht – wie in Abbildung 6 am Beispiel der Komponente 3, Acarbose (5), gezeigt – die jeweils niedrigere Komponente. Das Endprodukt Komponente 1 (8) läßt sich unter diesen Bedingungen nicht weiter umwandeln<sup>[23, 46, 79]</sup>. Die komplette saure Hydrolyse von 100 g des Rohpräparates BAY e 4609 ergibt etwa 500 mg (8). Die Ausbeute an höheren Komponenten, die nach Kurzzeit-Hydrolyse entstehen, liegt in der gleichen Größenordnung<sup>[46]</sup>. Bei Komponente 1 (8) handelt es sich um einen Tricyclus, dessen Struktur durch Abbaureaktionen, Derivatisierungen und spektroskopische Untersuchungen aufgeklärt wurde<sup>[46, 73, 79]</sup>. (8) bildet sich dadurch, daß nach Abspaltung eines Glucoserestes aus Komponente 2 (6) der

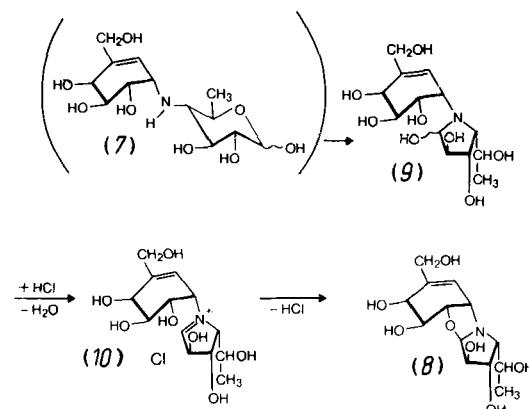


Abb. 7. Umwandlung des instabilen Pseudodisaccharids (7) in ein Pyrrolidin-Derivat (9) und dessen Dehydratisierung zu Komponente 1 (8).

freigesetzte Aminozucker (7) in der Pyranoseform nicht stabil ist. Es ist bekannt, daß sich 4-Aminopyranosen wie (7) in Pyrrolidin-Derivate umlagern und dann in saurer Lösung sehr leicht Wasser abspalten (Abb. 7). Die ungesättigte Verbindung (10) stabilisiert sich anschließend durch Addition einer benachbarten Hydroxygruppe der Cyclitol-Einheit an die CN-Doppelbindung. Das nichtkristalline, tricyclische Kondensationsprodukt (8) wird sehr glatt mit NaBH<sub>4</sub> unter Öffnung des 1,3-Oxazolidinrings reduziert (Abb. 8). Das erhaltene Aminocyclitol (11) ist unwirksam gegen  $\alpha$ -Amylase und Saccharase, obwohl der Cyclitolteil des Moleküls gegenüber den hochaktiven Komponenten 2–6 der homologen Reihe unverändert ist. Daraus folgt, daß die ungesättigte Hydroxymethylconduritol-Einheit al-

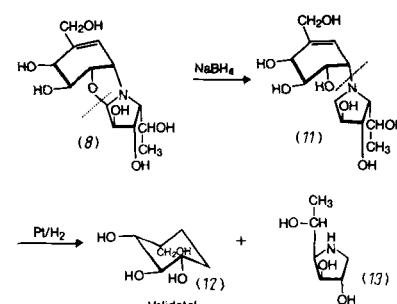
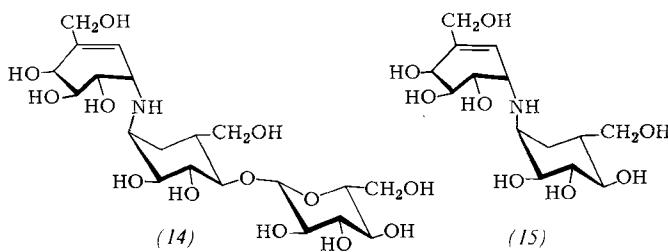
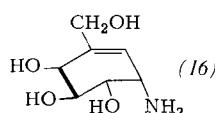


Abb. 8. Reduktion von Komponente 1 (8) mit NaBH<sub>4</sub> zum Aminocyclitol (11) und dessen katalytische Hydrierung [73].

lein für die Wirkung nicht ausreicht. Durch Hydrogenolyse am Platinkontakt läßt sich (11) in die Hauptprodukte Validatol (12)<sup>[81]</sup> und das Pyrrolidin-Derivat (13)<sup>[73]</sup> spalten. Validatol (12) wurde auch durch Abbau des Antibioticums Validamycin A (14) erhalten<sup>[81, 82]</sup>.



Weder Validamycin A (14) noch Validoxylamin A (15)<sup>[83]</sup> hemmen  $\alpha$ -Amylase oder Saccharase, obwohl sie als Baustein die ungesättigte Hydroxymethylcyclitol-Einheit enthalten. Durch mikrobiellen Abbau von Validamycin A (14) mit *Pseudomonas maltophilia* erhaltenes Valienamin<sup>[84]</sup> (16) erwies sich als schwach wirksamer Saccharase-Inhibitor<sup>[73]¶1</sup>.



Durch Selektion geeigneter Stämme und Optimierung der Kulturbedingungen sind die einzelnen Komponenten der homologen Reihe pseudooligosaccharidischer  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren wesentlich leichter und in höheren Ausbeuten zugänglich<sup>[25, 85, 86]</sup> als durch die saure Hydrolyse der Präparation BAY e 4609. Unter Verwendung von Glucose und Maltose im Kulturmedium des *Actinoplanes*-Stammes SE 50/110<sup>[86]</sup> wurden Kulturbrühen mit hohen Saccharase-Inhibitor-Titern erhalten, aus denen sich die Inhibitoren an Aktivkohle adsorbieren ließen. Fraktionierende Desorption mit steigender Ethanolkonzentration führte zu einer Rohpräparation, die durch Ionenaustauschchromatographie (Abb. 9) weiter gereinigt werden konnte<sup>[46]</sup>. Die Fraktionen C bis E sind zum Teil mit den durch saure Hydrolyse von BAY e 4609 erhaltenen Kom-

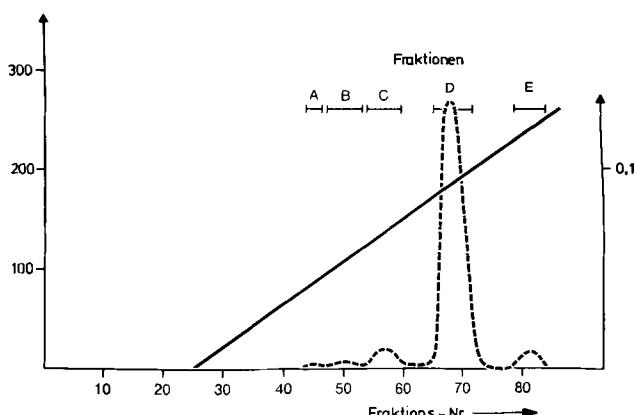


Abb. 9. Ionenaustauschchromatographie einer rohen Saccharase-Inhibitorpräparation aus dem Stamm SE 50/110 [46]. Bedingungen: Dowex 50 W  $\times$  4 H<sup>+</sup> (200–400 mesh); Säule: 0.9  $\times$  60 cm; Elution mit 10<sup>-3</sup> N Salzsäure bis Fraktions-Nr. 20, anschließend linearer Gradient mit zunehmender NaCl-Konzentration in 10<sup>-3</sup> N Salzsäure; Durchfluß: 30 mL/h, Fraktionen à 7.5 mL; linke Ordinate: SIE/ml (—); rechte Ordinate: NaCl-Konzentration [M] (---).

¶1 Hemmung anderer  $\alpha$ -Glucosidasen siehe [84b].

ponenten 2–4 identisch. Der Hauptanteil, ca. 80% der aus dieser Fermentation gewonnenen Saccharase-Inhibitoren (Fraktion D, Abb. 9), erwies sich als identisch mit Komponente 3 (Acarbose) (5). Die Fermentationsausbeute an Acarbose lag bei ca. 600 mg/L Kulturbrühe. Fraktion E konnte als die um eine Glucose-Einheit ärmere Komponente 2 identifiziert werden. Fraktion C hat die gleiche Zusammensetzung wie die oben erwähnte Komponente 4, und die Fraktionen A und B enthalten Isomerengemische der höheren Komponenten 6 und 5.

Weiteren Aufschluß über die für die  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibition essentiellen Bestandteile von Acarbose und damit auch der anderen Komponenten ergab die Hydrogenolyse-Reaktion mit Pt/H<sub>2</sub> (Abb. 10); durch Spaltung der allyli-

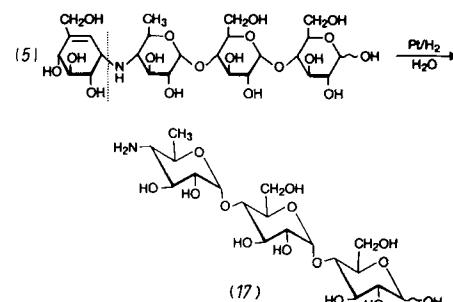


Abb. 10. Hydrogenolytische Abspaltung des basischen Trisaccharids (17) bei der katalytischen Hydrierung von Acarbose (5) [73].

schen C—N-Bindung läßt sich der Cyclitolrest entfernen, ohne daß das Restmolekül verändert wird<sup>[73]</sup>. Das basische Trisaccharid (17)<sup>[¶1]</sup> zeigt keine inhibitorische Wirkung gegenüber  $\alpha$ -Amylase oder Saccharase, d. h. der Aminozucker allein ist für die Wirkung nicht entscheidend. Da auch der ungesättigte Cyclitolrest allein für die Hemmwirkung nicht ausreichend ist, muß der aus beiden Bausteinen aufgebauten Pseudodisaccharidanteil für die Wirkung essentiell sein. Die Spaltung der allylischen C—N-Bindung ist nur eine, wenn auch bevorzugte Reaktionsmöglichkeit des Moleküls. Auch die beiden allylischen C—O-Bindungen werden leicht hydrogenolytisch gespalten (Abb. 11); daneben kann die Doppelbindung hydriert werden. Dabei ist mit der Bildung zweier diastereomerer Produkte mit L-ido-(18) und D-gluco-Konfiguration (19) zu rechnen. Da auch mehrere dieser Reaktionen nacheinander ablaufen können, entsteht bei der katalytischen Hydrierung der Acarbose (5) ein komplex zusammengesetztes Produktgemisch, das über Kationenaustauscher in der H<sup>+</sup>-Form zunächst in basische und nichtbasische Bestandteile getrennt wurde. Jede der beiden Hauptfraktionen wurde dann weiter chromatographisch gereinigt.

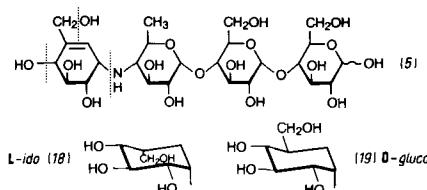


Abb. 11. Reaktionsmöglichkeiten der Acarbose (5) bei der katalytischen Hydrierung unter Erhaltung der Pseudotetrasaccharid-Struktur [73].

¶1 (17) wurde nach Acetylierung in einer Acetyllysereaktion in die drei Monosaccharidbausteine zerlegt und somit auf bekannte Verbindungen zurückgeführt [73].

An basischen Produkten (Abb. 12) wurden neben dem unwirksamen Trisaccharid (17) zwei Verbindungen mit Pseudotetrasaccharid-Struktur isoliert, die durch einfache

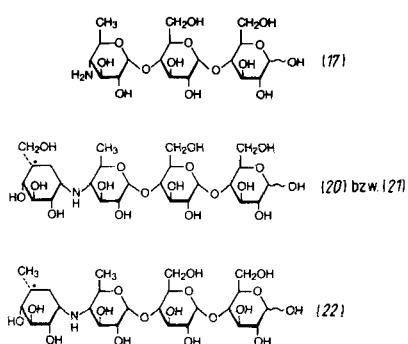
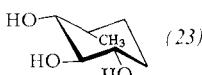


Abb. 12. Basische Produkte der katalytischen Hydrierung von Acarbose (5) [73].

Absättigung der Doppelbindung im Cyclitolrest entstanden waren. Verbindung (20), diejenige mit *L-ido*-Konfiguration im Cyclitolteil, zeigte keine Hemmwirkung mehr gegen  $\alpha$ -Amylase und Saccharase, Verbindung (21) mit *D-gluco*-Konfiguration im Cyclitolteil war zwar wirkungslos gegen  $\alpha$ -Amylase, zeigte aber noch eine gute Wirkung gegenüber Saccharase. (22), in dem zusätzlich die primäre Hydroxygruppe des Cyclitolrestes reduktiv entfernt worden war, hemmte keines der beiden Enzyme. Demnach ist die Doppelbindung im Cyclitolteil nur in quantitativer Hinsicht für die Wirkung von Bedeutung. An nichtbasischen Hydrogenolyseprodukten wurde dünnenschichtchromatographisch eine ganze Reihe von Cyclitol-Derivaten nachgewiesen, von denen Validatol (12) und 7-Desoxyvalidatol<sup>[81]</sup> (23) isoliert und identifiziert werden konnten<sup>[73]</sup>.



Auch die höheren Komponenten wurden hydrogenolysiert: Komponente 4 ergibt neben dem schon erwähnten

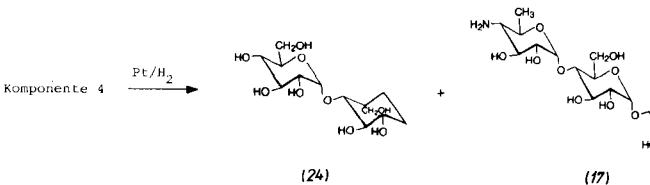


Abb. 13. Katalytische Hydrierung von Komponente 4 [73].

basischen Trisaccharid (17) hauptsächlich Validatolglucosid (24) (Abb. 13). Daneben werden aber auch Validatol (12) und ein basisches Tetrasaccharid (25) erhalten<sup>[46]</sup>.

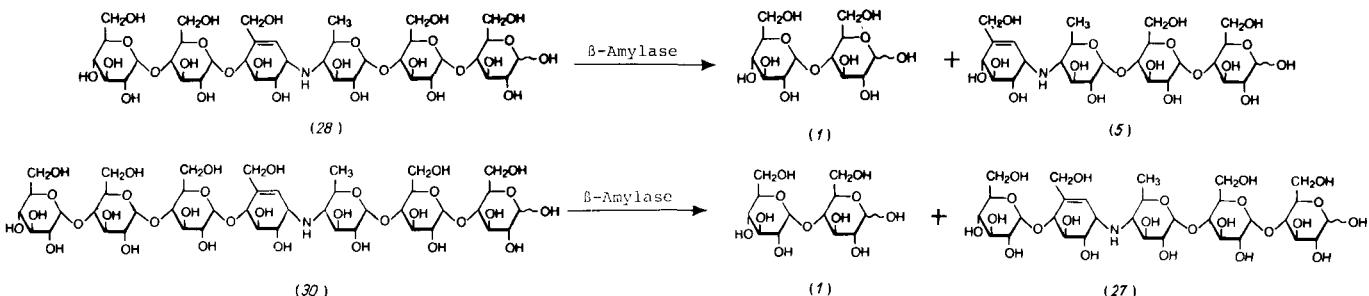
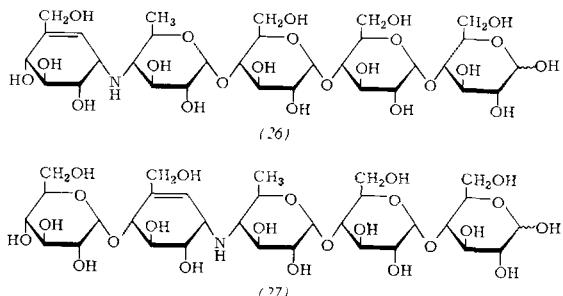


Abb. 15. Enzymatische Hydrolyse der Komponenten 5 und 6 mit den Haupt-Isomeren (28) bzw. (30) mit pflanzlicher  $\beta$ -Amylase („sweet potato“) [46].

Komponente 4 besteht demnach aus den beiden Isomeren (26) und (27), von denen (26) nur in geringem Anteil vor-



handen ist. Beide Isomere, die an stark sauren Ionenaustauschern getrennt werden konnten, sind aktiv im  $\alpha$ -Amylase- und Saccharase-Hemmtest, wobei das Isomer (26) das wirksamere ist. Auch die Komponenten 5 und 6 (vgl. Tabelle 4) erwiesen sich als Isomerengemische. Das Hauptisomer (28) der Komponente 5 wird zu Validatolmaltosid (29) und zum basischen Trisaccharid (17) hydrogenoliert (Abb. 14).

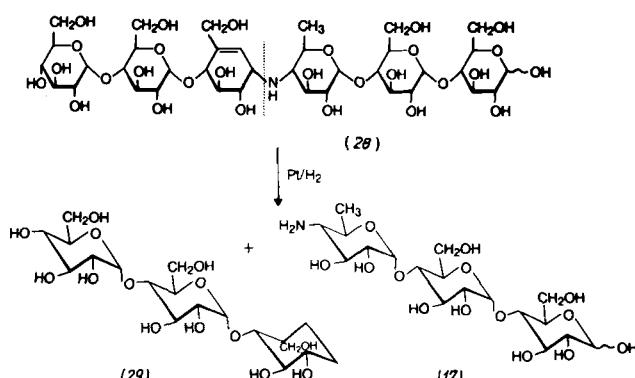
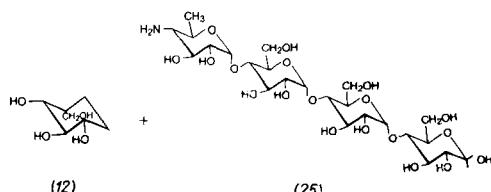


Abb. 14. Katalytische Hydrierung des Haupt-Isomers (28) von Komponente 5 [73].

Die so erhaltenen Informationen über die Konstitution einzelner Glieder der homologen Reihe pseudooligosac-



charidischer  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren der allgemeinen Formel (4) wurden bestätigt und ergänzt durch enzymatische Abbaureaktionen mit pflanzlicher  $\beta$ -Amylase, die we-

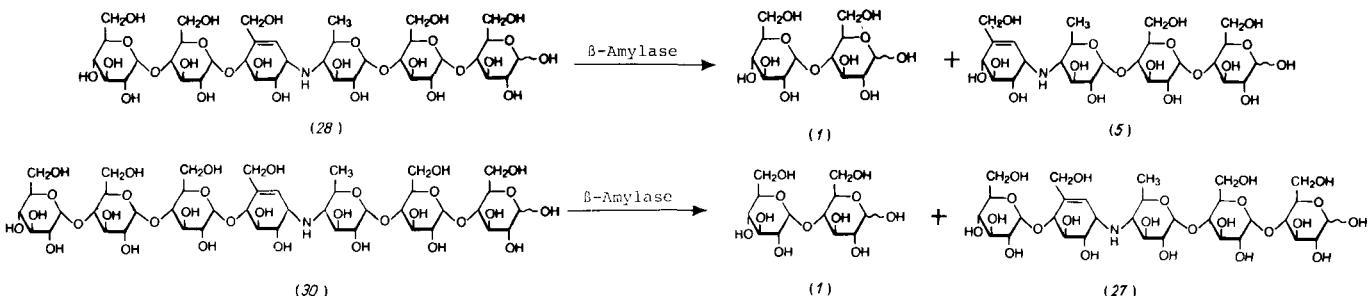


Abb. 15. Enzymatische Hydrolyse der Komponenten 5 und 6 mit den Haupt-Isomeren (28) bzw. (30) mit pflanzlicher  $\beta$ -Amylase („sweet potato“) [46].

sentlich schwächer als andere  $\alpha$ -Glucosidasen durch die betreffenden Komponenten gehemmt wird. Wie aus Abbildung 15 erkennbar, wird aus den beiden Hauptanteilen (28) und (30) der in den Komponenten 5 bzw. 6 vorliegenden Isomerengemische jeweils ein Maltoserest abgespalten; als weitere Produkte werden Acarbose (5) und das Komponente 4-Isomer (27) gebildet.

## 6. Hemmspektrum der Acarbose und der homologen Pseudoooligosaccharide

Die einzelnen, im vorigen Abschnitt näher beschriebenen Komponenten der homologen Reihe unterscheiden sich in ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas und Saccharase aus Schweinedünndarm (Abb. 16). Die höchste spezifische  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor-Aktivität hat eine Komponente-6-Präparation mit minimaler Saccharase-Inhibitor-Aktivität. (Der Verlauf der Hemmkurve in Abhängigkeit von der Konzentration an Komponente-6-Präparation ist bis zu etwa 70%  $\alpha$ -

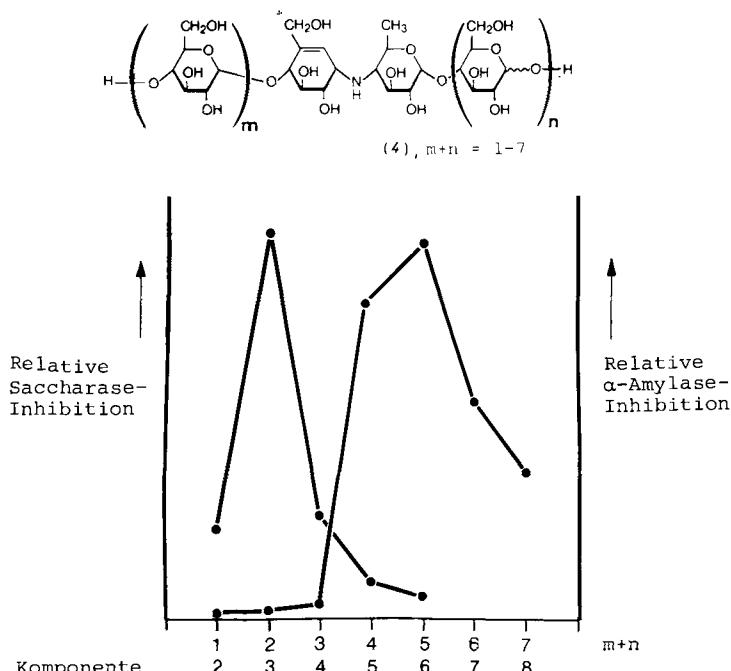


Abb. 16. Relative Saccharase- und  $\alpha$ -Amylase-Inhibition der Komponenten 2 bis 8 [43].

Tabelle 7. Zur Hemmung ( $ID_{50}$  [a]) der Aktivität intestinaler  $\alpha$ -Glucosidasen in vitro [b] notwendige Mengen (in ng) von Acarbose (5) und von Homologen der allgemeinen Formel (4) [45].

Komponente	Anzahl der Glucosereste $m+n$ in (4)	Maltase 10 mU [c]	Isomaltase 10 mU	„Dextrinase“ 29 mU	Glucoamylase 10 mU	$\alpha$ -Amylase 100 mU	Saccharase 10 mU
2	1	100	43 500	205	83	855	500
3 (Acarbose)	2	15	42 000	64	9.3	680	74
4	3	80	54 500	93	39	1135	455
5	4	236	> 100 000	100	110	4.7	700
6	5	1000	> 100 000	93	410	2.8	700
BAY e 4609	7-30	8250	> 100 000	810	8000	14.5	60 000

[a] Inhibitormenge in ng pro Testansatz, die für eine 50% Hemmung erforderlich ist. [b] Testansätze für Enzyme, die Glucose freisetzen: 0.01 mL Inhibitorlösung in multiplen Verdünnungen mit 0.1 mL Enzympräparation für 10 min vorinkubiert, mit 0.1 mL Substratlösung inkubiert, mit 1 mL Glucose-Dehydrogenase-Reagens in 0.5 M Tris-Puffer abgestoppt, während 30 min zur Glucosebestimmung entwickelt und bei 340 nm photometriert. Substratlösungen und Inkubationszeiten: 0.4 M Saccharose für 20 min; 50 mM Maltose für 10 min; 40 mM Isomaltose für 10 min; 5% Stärkelösung für 20 min. Testansatz für Dextrinase: 0.01 mL Inhibitorlösung in multiplen Verdünnungen mit 0.1 mL Enzympräparation für 10 min vorinkubiert, mit 0.1 mL 5% Grenzdextrinlösung für 20 min inkubiert, mit 0.5 mL Dinitrosalicylsäure-Reagens [33] versetzt, 5 min auf 95 °C erhitzt, mit 1.5 mL Wasser verdünnt und bei 540 nm photometriert. Testansatz für  $\alpha$ -Amylase: 0.01 mL Inhibitorlösung in multiplen Verdünnungen mit 0.2 mL Enzympräparation (Schweinepankreas- $\alpha$ -Amylase) für 10 min vorinkubiert, mit 0.2 mL 5% Stärkelösung für 5 min inkubiert, mit 0.5 mL Dinitrosalicylsäure-Reagens [33] versetzt, 5 min auf 95 °C erhitzt, mit 2.5 mL Wasser verdünnt und bei 540 nm photometriert. [c] 1 U ist diejenige Menge Enzym, welche unter Standardbedingungen 1  $\mu$ mol Substrat je min umsetzt. 1 U = 16.67 nkat.

Amylasehemmung linear. Durch Extrapolation auf 100% Hemmung lässt sich eine Inhibitormenge ermitteln, aus der ein Enzym-Inhibitor-Verhältnis von 1:1 abgeschätzt werden kann.)

Die  $\alpha$ -Amylase-Inhibitorwirkung fällt bei den höheren Komponenten wieder ab, während Acarbose (5) maximale Saccharase-Inhibitorwirkung zeigt (Abb. 16). In Tabelle 7 sind die inhibitorischen Aktivitäten verschiedener Komponenten gegenüber  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas und den intestinalen Oligo- und Disaccharidasen aus Schweinedünndarm aufgelistet. Als Maß für die inhibitorische Aktivität ist die Inhibitormenge angegeben, die unter Testbedingungen 50% Enzymhemmung bewirkt. Acarbose (5) hat auch für die anderen dünndarmwandständigen  $\alpha$ -Glucosidasen die höchste spezifische Inhibitoraktivität. Die Isomaltaseaktivität der Enzympräparation aus Schweinedünndarm wird von den niederen Komponenten äußerst schwach (im Vergleich zu Nojirimycin und 1-Desoxynojirimycin, siehe Abschnitt 8, Tabelle 10), von den höheren Komponenten fast überhaupt nicht gehemmt. Hingegen ist die Hemmung der als „Dextrinase“ bezeichneten Enzympräparation (Substrat: durch  $\alpha$ -Amylase aus Schweinepankreas bis zu Grenzdextrinen abgebautes Glycogen) beachtlich [43b, 45, 46].

Eine Reihe von Enzymen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen (vgl. Tabelle 8) wurde auf eine mögliche Hem-

Tabelle 8. Hemmspektrum von Acarbose (5) gegenüber Enzymen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen [87].

Enzym	Provenienz	Substrat	Hemmung [a]
$\alpha$ -Amylase	<i>B. subtilis</i>		+
$\alpha$ -Amylase	<i>A. oryzae</i>		+
$\alpha$ -Amylase	Gersten-Malz		+
$\beta$ -Amylase	„sweet potato“		–
$\beta$ -Amylase	<i>B. polymyxa</i>		–
Glucoamylase	<i>A. niger</i>		+
Invertase	<i>Saccharomyces sp.</i>	Saccharose	–
$\alpha$ -Glucosidase		Maltose	+
$\beta$ -Glucosidase	Mandeln	Cellobiose	–
$\beta$ -Galactosidase	<i>Saccharomyces fragilis</i>	Lactose	–
Dextranurase	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Saccharose	–
Pullulanase	<i>Aerobacter aerogenes</i>	Pullulan	–
Isoamylase	<i>Cytophaga sp.</i>	Glykogen	–
Cyclodextrin-glucosyl-Transferase	<i>B. macerans</i>	Stärke	+

[a] Hemmung: +, keine Hemmung: –.

mung durch Acarbose (5) geprüft<sup>[87]</sup>:  $\alpha$ -Amylasen aus *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* und Gersten-Malz sowie Glucoamylase aus *Aspergillus niger* und  $\alpha$ -Glucosidase aus Hefe (*Saccharomyces sp.*) werden gehemmt. Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, wird die *Aspergillus*-Glucoamylase am

Tabelle 9. Konzentrationen an Acarbose (5), die für eine 50% Hemmung verschiedener  $\alpha$ -Glucosidasen benötigt werden [87].

Enzym	Bezeichnung oder Herkunft	Inhibitor- Konzentration [µg/mL]
$\alpha$ -Amylase	„Bacterial saccharifying“	0.3
	„Bacterial liquefying“	40.9
	<i>Aspergillus oryzae</i>	180.0
	Schweinepankreas	3.8
	Gersten-Malz	83.5
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	0.04
$\alpha$ -Glucosidase	<i>Saccharomyces sp.</i>	70.0

stärksten inhibiert<sup>[87]</sup>. Weiterhin wird Cyclodextrin-glucosyl-Transferase gehemmt, während bei Muskel-Phosphorylase keine Hemmung auftritt<sup>[87]</sup>.

Ausgehend von Acarbose (5) wurde durch Abwandlung der reduzierenden Glucose-Einheit an der freien Carboxylgruppe eine Reihe semisynthetischer Glycosid-Derivate hergestellt und geprüft<sup>[73]</sup>. In einigen Fällen wurde eine Steigerung der Saccharase-inhibitorischen Wirkung bis zum Faktor drei gefunden, jedoch wies keines der Derivate, besonders wenn man die aufwendige Herstellung berücksichtigt, Vorteile gegenüber Acarbose auf<sup>[73]</sup>.

## 7. Weitere pseudooligosaccharidische $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren

Kürzlich wurden mikrobielle  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren bekannt, die auch Glieder einer homologen Reihe sind und von denen angenommen wird, daß sie das gleiche „core“ wie die in Abschnitt 5 beschriebenen Pseudooligosaccharide enthalten. Aus Kulturbrühen von *Streptomyces dimorphogenes* NR-320-OM7HB und NR-320-OM7HBS wurden drei (durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie trennbare) basische Aminozucker-Derivate isoliert, die als Trestatin A (31), B (32) und C bezeichnet wurden<sup>[70]</sup>. Die osmometrisch bestimmten Molekulargewichte betragen 1470, 975 bzw. 1890. Die für Trestatin A und B angenommenen Strukturen (Abb. 17) folgen einerseits aus spektroskopischen

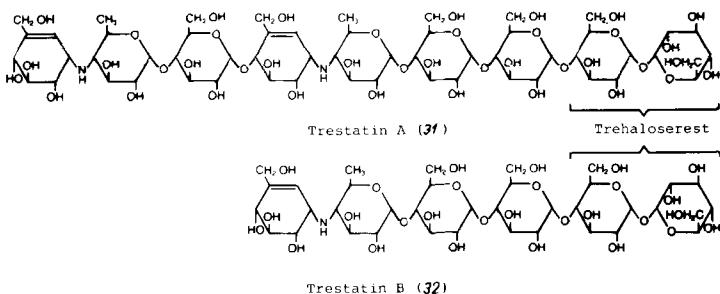
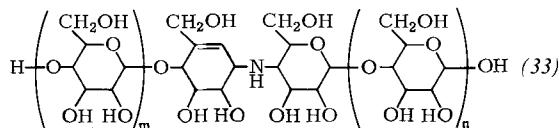


Abb. 17. Postulierte Strukturen von Trestatin A (31) und B (32) [70].

schen Studien und andererseits aus Untersuchungen der Hydrolyseprodukte (4 N Salzsäure, 3 h bei 80 °C). Hydrolyseprodukte der drei Trestatine, die als gemeinsames Strukturmerkmal je einen Trehaloserest enthalten, sind Glucose

und ein Amin ( $pK_a = 3.9$ ) der Bruttoformel  $C_{13}H_{21}NO_7^{[**]}$ ). Trestatin A (31) enthält pro Molekül zwei und Trestatin C drei Pseudodisaccharidreste; beide zeigen relativ hohe spezifische Inhibitor-Aktivitäten gegenüber Schweinepan-  
kreas- $\alpha$ -Amylase ( $7.1 \cdot 10^7$  IE/g bzw.  $4.9 \cdot 10^7$  IE/g $^{[**]}$ ). Tre-  
statin B (32) mit nur einem Pseudodisaccharidrest pro Mo-  
lekül weist eine geringere spezifische Aktivität ( $1.5 \cdot 10^6$   
IE/g $^{[**]}$ ) auf.

$\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren, bei denen es sich um Glie-  
der einer homologen Reihe der allgemeinen Formel (33)  
handelt, werden von Mikroorganismen der Gattung *Strep-  
tomyces* (z. B. A 2396) produziert<sup>[68]</sup>. Der einzige struktu-  
relle Unterschied zur Acarbose-Reihe liegt darin, daß der  
4-Amino-4,6-didesoxyglucose-Rest gegen einen 4-Amino-



4-desoxyglucose-Rest ausgetauscht ist. In der Patentanmeldung<sup>[68]</sup> werden die Aminozucker (33) mit  $m=0$  bis 8 und  $n=1$  bis 8 beansprucht, wobei  $m+n=1,2,\dots,8$  ist. Die Struktur wurde hauptsächlich aus spektroskopischen Daten abgeleitet. Die höheren Glieder der homologen Reihe sind stärker wirksam gegenüber  $\alpha$ -Amylase als die niederen. Weiterhin werden inhibitorische Wirkungen gegenüber Saccharase und Maltase erwähnt.

Murao et al.<sup>[51-53]</sup> untersuchten einen pseudooligosaccharidischen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor (Amylostatin, S-AI) (34), der aus Kulturbrühen von *Streptomyces diastaticus* subsp. *amylostaticus* No. 2476 gewonnen wurde. Seine Struktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt, weist aber auffallende Ähnlichkeit mit Gliedern der homologen Acarbose-Reihe auf. Der Inhibitor wurde nach Chromatographie und anschließender Reinigung über einen Enzym-Inhibitor-Komplex mit „bacterial liquefying  $\alpha$ -amylase“ (BLA) isoliert<sup>[52]</sup>. S-AI (34) ( $MG \approx 1500$ ) wird als „substrate analog inhibitor“<sup>[53]</sup> bezeichnet; sein inhibitorisches Spektrum umfaßt außer menschlicher Speichel-Amylase und Schweinepankreas-Amylase eine Reihe von  $\alpha$ -Amylasen aus Bakterien und Pilzen. Weiterhin werden *Rhizopus-niveus*-Glucoamylase und Malz- $\alpha$ -Amylase gehemmt. Nicht gehemmt werden intestinale Säugetier-Saccharase sowie pflanzliche  $\beta$ -Amylasen und eine Reihe mikrobieller  $\alpha$ -Glucosidasen. S-AI (34) enthält einen reduzierenden terminalen Glucoserest sowie fünf weitere 1→4-glucosidisch verknüpfte Glucosereste. Mit  $\beta$ -Amylase lassen sich zwei Maltosereste abspalten. Das Restmolekül wurde als „glucosyl-S-AI-X-glucose“ bezeichnet<sup>[53]</sup>. Durch enzymatische und/oder chemische Methoden konnte aus S-AI (34) noch ein weiteres Derivat, S-AI-XG<sup>[72a]</sup> ( $MG \approx 500$ ), erhalten werden, das aus dem unbekannten, Stickstoff enthaltenden Molekülteil und einem reduzierenden Glucoserest besteht. Abbildung 18 gibt einen schematischen Strukturvorschlag<sup>[53]</sup> für S-AI (34) wieder. Hiernach korrespondiert das angedeutete aktive Zentrum der BLA mit acht bis zehn Glucoseresten des Substrats, und es „paßt“ auch auf den unbekannten, für

[\*] Komponente 1 (8) hat die gleiche Bruttoformel.

[\*\*] Wegen unterschiedlicher Testbedingungen sind diese Werte nicht mit den in Abschnitt 5 angegebenen vergleichbar.

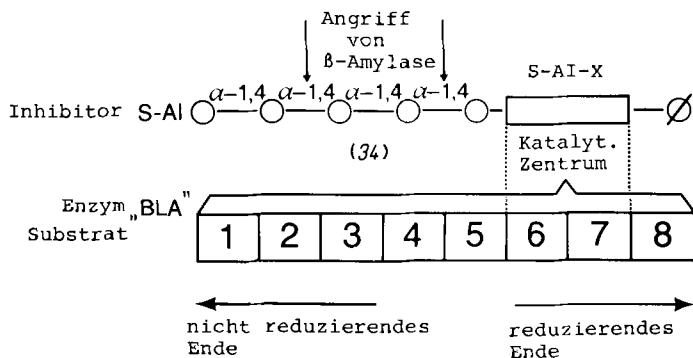


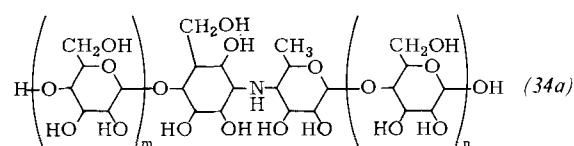
Abb. 18. Strukturvorschlag für den mikrobiellen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor S-AI (34) und postulierter Bindungsmechanismus zwischen S-AI und „bacterial liquefying amylase“ (BLA) nach Murao und Ohyama [53], ( $\emptyset$ : reduzierender Glucoserest).

die Hemmwirkung essentiellen Molekülteiles S-AI-X von S-AI (34).

Weitere N-haltige, oligosaccharidische  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren, TAI-A und TAI-B, wurden aus Kulturbrühen von *Streptomyces calvus* TM-521 isoliert<sup>[69]</sup>. Ihre Molekulargewichte betragen 950–1050 bzw. 650–700, sie enthalten zwei oder mehrere Glucosereste und als einen basischen Rest wahrscheinlich eine Aminozucker-Einheit. Durch das Fehlen von Methylgruppen unterscheiden sich TAI-A und TAI-B von den Gliedern der homologen Acarbose-Reihe mit der allgemeinen Formel (4). Das Hemmspektrum umfaßt menschliche Speichel-Amylase, Schweinepankreas-Amylase, *Rhizopus-niveus*-Glucoamylase, Taka-Amylase<sup>[\*]</sup> (nur TAI-A) sowie „bacterial saccharifying  $\alpha$ -amylase“, nicht aber BLA.

Ein Glucoamylase- und  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor, NCGAI, wurde aus Kulturbrühen von *Streptomyces spec.* Nr. 33 gewonnen<sup>[64]</sup>. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 600, und es wird angenommen, daß NCGAI hauptsächlich aus Glucoseresten besteht. Am stärksten wird Glucoamylase gehemmt, während die Inhibition von Speichel-Amylase und BLA schwächer ausgeprägt ist.

Kürzlich wurde eine Patentanmeldung offengelegt<sup>[72b]</sup>, in der drei  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren (aus *Streptomyces myxogenes* SF-1130, ATCC 31305) der allgemeinen Formel (34a) beschrieben werden; es handelt sich um Oligosaccharide mit schwach basischem Charakter. Neben ihrer inhibitorischen Wirkung gegenüber intestinaler Säugetier- $\alpha$ -Glucosidase und -Saccharase zeigen diese Substanzen auch noch eine schwache antibakterielle Wirkung; sie werden daher als Antibiotika SF-1130-X<sub>1</sub>, -X<sub>2</sub> und -X<sub>3</sub> bezeichnet. SF-1130-X<sub>3</sub> (MG ≈ 830) ist ein starker  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitor.



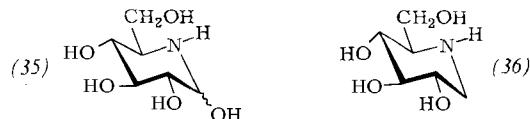
Antibiotikum SF-1130-X<sub>1</sub>, m + n = 5

Antibiotikum SF-1130-X<sub>2</sub>, m + n = 4

Antibiotikum SF-1130-X<sub>3</sub>, m = 0, n = 3

## 8. Nojirimycin und 1-Desoxynojirimycin

Nojirimycin (35) wurde zuerst als ein von *Streptomyces roseochromogenes* R-468 sowie von *Streptomyces lavendulae* SF-425 gebildetes Antibioticum beschrieben<sup>[56, 58]</sup>.



Durch katalytische Hydrierung von (35) am Platin-Kontakt oder durch Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> wurde das 1-Desoxynojirimycin (36) erhalten<sup>[56, 58]</sup>; (35)<sup>[58]</sup> und (36)<sup>[57]</sup> sind auch totalsynthetisch zugänglich. Später konnte gezeigt werden, daß (35) ein potenter Inhibitor von  $\beta$ -Glucosidasen (Emulsin,  $\beta$ -Glucosidasen aus Pilzen) ist<sup>[59, 60]</sup>; in geringerem Ausmaß hemmt es auch mikrobielle  $\alpha$ -Glucosidasen. (36) hemmt Emulsin wesentlich schwächer als (35)<sup>[59]</sup>. Ein Screening auf Inhibitoren von intestinalen Säugetier- $\alpha$ -Glucosidasen ergab, daß (35) und (36) auch von zahlreichen Stämmen der Gattung *Bacillus* gebildet werden<sup>[44, 55]</sup>. Aus den Stämmen *B. amyloliquefaciens* (DSM 7), *B. polymyxa* (DSM 365), *B. subtilis* (DSM 704)<sup>[\*]</sup> und *B. subtilis* var. *niger* (DSM 675) wurden nach Fermentation (4–6 d) in Nährösungen, die Stärke oder Maltose enthielten, Kulturfiltrate mit relativ hohen Titern an Saccharase-Inhibitor-Einheiten erhalten. Die Inhibitoren ließen sich an stark saure Kationenaustauscher (H<sup>+</sup>-Form) binden, mit wäßrigem Ammoniak eluieren und chromatographisch weiter reinigen. Aus den eingeengten, hemmaktiven Fraktionen kristallisierte (36) als farblose Schuppen (Fp = 206 °C)<sup>[44]</sup>. Es wurde auch aus Maulbeerbaumblättern<sup>[61]</sup> isoliert und als Moranoline bezeichnet. Später wurde (36) durch Fermentation der *Streptomyces-lavendulae*-Stämme SEN-158<sup>[62]</sup> und subsp. *trehalostaticus* Nr. 2882<sup>[63]</sup> erhalten. (35) und (36) erwiesen sich als potente Inhibitoren intestinaler Oligo- und Disaccharidasen von Säugetieren (Tabelle 10)<sup>[44]</sup>.

Tabelle 10. Molare Konzentration von Nojirimycin (35) und 1-Desoxynojirimycin (36) zur 50% Hemmung intestinaler  $\alpha$ -Glucosidasen [44].

Inhibitor	Saccharase	Maltase	Isomaltase	Glucosidase
Nojirimycin	5.6 · 10 <sup>-7</sup> M	1.7 · 10 <sup>-6</sup> M	2.5 · 10 <sup>-7</sup> M	7.6 · 10 <sup>-7</sup> M
1-Desoxynojirimycin	2.2 · 10 <sup>-7</sup> M	1.3 · 10 <sup>-7</sup> M	1.3 · 10 <sup>-7</sup> M	9.6 · 10 <sup>-8</sup> M
mU Enzym in 0.21 mL Inkubations- volumen bei 37 °C	11.1	11.8	11.5	10.1

Testansätze: 0.01 mL Inhibitorlösung in multiplen Verdünnungen mit 0.1 mL Enzympräparation für 10 min vorinkubiert, mit 0.1 mL Substratlösung inkubiert, mit 1 mL Glucose-Dehydrogenase-Reagens in 0.5 M Tris-Puffer abgestoppt, während 30 min zur Glucosebestimmung entwickelt und bei 340 nm photometriert. Substratlösungen und Inkubationszeiten: 0.4 M Saccharose für 20 min; 50 mM Maltose für 10 min; 40 mM Isomaltose für 10 min; 5% Stärkelösung für 20 min. Nojirimycin mit Bariumhydroxid aus dem Hydrogensulfat-Addukt freigesetzt, mit Glucose-Dehydrogenase-Reagens quant. bestimmt und unmittelbar zum Hemmtest eingesetzt.

Pankreas- $\alpha$ -Amylase wird fast nicht gehemmt. Kürzlich wurde gefunden, daß (36) ein potenter Inhibitor von Tre-

[\*] Taka-Amylase ist ein kommerzielles Rohprodukt aus Kulturen von *A. oryzae*, das Stärke bis zu Glucose abbaut.

[\*] Dieser Stamm wurde von U. Heber, Botanisches Institut der Universität Düsseldorf, isoliert.

halasen (von Kaninchen sowie von *Chaetomium aureum* MS-27) sowie von *Rhizopus-niveus*-Glucoamylase und von *exo-β-1→3-Glucanase* (*Penicillium*) ist<sup>[63]</sup>.

## 9. Kohlenhydrathaltige Polypeptide, die α-Amylase inhibieren

*Ueda et al.* erhielten aus Kulturbrühen von *Streptomyces spec.* Nr. 280, einer Variante von *Streptomyces flavochromogenes*, kohlenhydrathaltige, peptidartige Substanzen, die in roher Form eine ganze Reihe von α-Glucosidasen, Glucosyl-Transferasen und Phosphorylasen (vgl. Tabelle 11) hemmen<sup>[47–50]</sup>. Durch verschiedene Trennungsschritte

Tabelle 11. Enzyme, die durch eine rohe α-Glucosidasen-Inhibitorpräparation aus *Streptomyces flavochromogenes* gehemmt werden [47–50].

Enzym	Hemmung
Glucoamylase ( <i>Rhizopus</i> )	stark
α-Amylase (Speichel, human)	stark
α-Amylase (Pankreas, human)	stark
α-Amylase ( <i>Bacillus</i> )	schwach
α-Amylase ( <i>Bacillus</i> , „bacterial saccharogenic“)	stark
α-Amylase ( <i>Aspergillus</i> )	schwach
α-Glucosidase (Saccharase, Rattendünndarmmucosa)	stark
α-D-Glucosidase ( <i>Mucor</i> )	stark
α-D-Glucosidase (Hefe)	stark
Cycloamylose-glucosyl-Transferase	stark
Phosphorylase a (Kaninchenmuskel)	stark
Phosphorylase (Kartoffel)	stark

gelang die Isolierung von vier einheitlichen (Papierchromatographie, Papierelektrophorese) Glycopeptid-Fraktionen A, B, B' und C<sup>[49]</sup>. Der Kohlenhydratanteil besteht hauptsächlich aus Glucose, und die Molekulargewichte betragen 1300 (für C) bis 4000. Die gereinigten Inhibitoren weisen unterschiedliche Aktivitäten gegenüber den Enzymen in Tabelle 11 auf<sup>[49]</sup>. Im Verlaufe der Kultivierung des Organismus (in einem Medium mit 3% Hafermehl) findet ein enzymatischer Abbau des Kohlenhydratanteils der Inhibitoren durch *Streptomyces*-Amylase statt<sup>[50]</sup>. Ein zusätzlicher proteolytischer Abbau während der Fermentation wird nicht ausgeschlossen. Eine Amylase-Präparation wurde aus dem Inhibitor-Produzenten-Stamm isoliert und für Abbaupversuche mit einem nach Fermentation (24 h) erhaltenen Roh-Inhibitor (wahrscheinlich Glycopeptid-Fraktion A, MG≈4000) verwendet. Als Hydrolyseprodukte wurden hauptsächlich Maltose neben Spuren von Maltotriose und Glucose erhalten. Die inhibitorische Aktivität der resultierenden „Rest-Inhibitoren“ blieb praktisch unverändert gegenüber *Rhizopus*-Glucoamylase, sie nahm leicht ab gegenüber Schweinepankreas-Amylase und Rattendünndarm-Saccharase. Dagegen ging die Hemmwirkung gegenüber Kaninchenmuskel-Phosphorylase a fast vollständig verloren. Diese Wirkung hängt demnach stark von der Kettenlänge des Kohlenhydratanteils ab. Eine ähnliche abbauende Wirkung wie die *Streptomyces*-Amylase auf den Inhibitor hatten auch Schweinepankreas- und Taka-Amylase. Demnach müssen die Glycopeptid-Inhibitoren A, B, B' und C als durch Bioconversion gebildete multiple Formen eines ursprünglich nativen Inhibitors betrachtet werden.

Ein Glycopeptid aus Kulturbrühen von *Streptomyces calidus* DS 26320 (MG zwischen 10000 und 20000) hemmt Pankreas-Amylase sowie die Saccharase- und Maltase-Akti-

tivität einer Enzympräparation aus Rattendünndarm<sup>[65]</sup>. Saure Hydrolyse ergibt Lysin und Monosaccharide, hauptsächlich Glucose.

## 10. Protein-Inhibitoren

Aus Kulturbrühen von *Streptomyces tendae* wurde ein Inhibitor für Säugetier-α-Amylasen (HOE 467) isoliert, bei dem es sich um ein Oligopeptid (MG≈7400) handelt<sup>[66, 67a]</sup>. Die α-Amylase-Inhibition ist irreversibel. Der einzige Lysinrest im Molekül ist möglicherweise Teil des aktiven Zentrums des Inhibitors. Später wurde der Inhibitor in zwei Fraktionen (A und B) getrennt und die Aminosäuresequenz der Fraktion HOE 467 A aufgeklärt<sup>[67b]</sup>.

Zwei weitere, einander sehr ähnliche kohlenhydratsfreie Protein-Inhibitoren (MG≈8500), Haim I und II<sup>[1]</sup>, wurden aus Kulturbrühen von *Streptomyces griseosporeus* (wahrscheinliche Identität) YM-25 isoliert<sup>[71, 72]</sup>; sie wurden durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie isoliert. Die Inhibitoren zeigen etwa die gleiche spezifische Aktivität gegenüber α-Amylase aus Schweinepankreas; sie unterscheiden sich elektrophoretisch und in den isoelektrischen Punkten (pH 4.0 bzw. 3.8). Auch werden Pankreas-Amylase anderer Spezies sowie menschliche Speichel-Amylase gehemmt. Mikrobielle und pflanzliche Glucosidasen werden nicht gehemmt. Der Hemmverlauf bei Schweinepankreas-Amylase ist linear bis zu 80% Hemmung. Vollständige Hemmung wird nicht erreicht; Extrapolation auf 100% Hemmung ergibt ein molares Verhältnis von Enzym zu Inhibitor wie 1:1. Der Mechanismus der Hemmung wird durch Protein-Protein-Wechselwirkung erklärt, wobei eine Bindung in der Nähe des aktiven Zentrums der α-Amylase angenommen wird. Beide Inhibitoren haben eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung sowie einen hohen Gehalt an Asparaginsäure (15.4 bzw. 15.0 Mol%) und Alanin (12.8 bzw. 12.5 Mol%); sie enthalten weder Lysin noch Methionin.

Aus Kulturfiltraten von *Streptomyces fradiae* (FERM-P 2303) wurde ein α-Amylase-Inhibitor durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie (Sephadex G-50, DEAE- und TEAE-Cellulose) erhalten<sup>[54]</sup>. Das als X-2 bezeichnete Präparat (MG≈6500) ist ein kohlenhydratsfreies, saures Polypeptid mit N-terminaler Asparaginsäure (oder Asparagin).

## 11. Mechanismus der Saccharase-Hemmung durch Acarbose, Nojirimycin und 1-Desoxynojirimycin

Der Mechanismus der α-Glucosidase-Hemmung durch mikrobielle Inhibitoren wurde von *Semenza et al.*<sup>[88]</sup> am isolierten Saccharase-Isomaltase-Komplex aus Kaninchen-Dünndarm<sup>[89]</sup> sehr genau untersucht. Acarbose (5) hemmt die Saccharase-Aktivität von Dünndarm-Disaccharidasen-Präparationen verschiedener Spezies nach einem voll kompetitiven Mechanismus<sup>[23, 88, 90, 91]</sup>. Die in Tabelle 12 aufgelisteten Inhibitorkonstanten ( $K_i$ -Werte) liegen je nach Spezies in der Größenordnung von  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  mol/L. Der  $K_i$ -Wert von Komponente 2 (6) beträgt  $7.04 \cdot 10^{-7}$  mol/L (Schweinedünndarm-Saccharase, Methode: „Dixon plot“).

[\*] Haim = hog pancreatic α-amylase inhibitor of microbe.

Tabelle 12. Saccharase-Inhibitor-Konstanten ( $K_i$ ) von Acarbose (5); Substrat: Saccharose.

Provenienz der Dünndarm-Disaccharidasen-Präparation	$K_m$ [mol/L]	$K_i$ [mol/L]	pH	Methode	Lit.
Mensch	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$1.3 \cdot 10^{-6}$	6	„Dixon plot“	[90, 91]
Schwein	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$2.6 \cdot 10^{-7}$	6.25		[23]
Ratte	—	ca. $4 \cdot 10^{-7}$	—	„Henderson plot“	[91]
Kaninchen [a]	$8 \cdot 10^{-3}$	$4.7 \cdot 10^{-7}$	6.8		[88]

[a]  $K_m$ -Wert laut [92, 93].

Nojirimycin (35) und 1-Desoxynojirimycin (36) sind ebenfalls voll kompetitive Saccharase-Inhibitoren. Die  $K_i$ -Werte (Kaninchen-Enzympräparation, Methode: „Henderson plot“ („steady state“-Geschwindigkeiten)) betragen bei pH 6.8, dem Optimum der Saccharaseaktivität,  $1.27 \cdot 10^{-7}$  mol/L bzw.  $3.2 \cdot 10^{-8}$  mol/L<sup>[88]</sup>. Somit sind diese vier Substanzen die stärksten, ungewöhnlich fest bindenden Saccharase-Inhibitoren. Ihre Affinität zum Enzym ist fünf bzw. sechs Zehnerpotenzen größer als die des Substrats Saccharose ( $K_m \approx 8 \cdot 10^{-3}$  mol/L<sup>[92, 93]</sup>).

Die Reaktion von (5), (35) und (36) mit dem Enzym ist langsam<sup>[88]</sup>: der „steady state“ wird in Minuten erreicht. Die Struktur dieser Inhibitoren sowie die pH-Abhängigkeit ihrer  $K_i$ -Werte lassen auf eine Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum der Saccharase-Untereinheit schließen; diese Ergebnisse stützen den von Cogoli und Semenza<sup>[92]</sup> vorgeschlagenen Wirkungsmechanismus der Saccharase. Die einzelnen Schritte der Saccharasewirkung sind in Abbildung 19 schematisch dargestellt. In vereinfachter Form lässt sich zusammenfassend sagen, daß das aus einem Glucose- und einem Fructoserest bestehende Substratmolekül im ersten Schritt (A) unter Deformation des Glucopyranoseringes vom aktiven Zentrum des Enzyms gebunden wird. In zwei Teilschritten (B und C) wird dann die glycosidische Sauerstofffunktion in 1-Position mögli-

cherweise durch die  $\gamma$ -ständige Carboxygruppe eines Glutaminsäurerestes im aktiven Zentrum des Enzyms<sup>[94]</sup> protoniert; im Schritt D wird der Fructoserest unter Bildung eines Carbenium-Ions, das durch das benachbarte Sauerstoffatom und eine Carboxylatgruppe des aktiven Zentrums stabilisiert wird, abgespalten. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich hier um die  $\beta$ -ständige Carboxylatgruppe eines Asparaginsäurerestes<sup>[88, 94, 95]</sup>. Im letzten Schritt (E) reagiert das Carbenium-Ion – eventuell über eine kovalente Zwischenstufe – mit Wasser zur  $\alpha$ -D-Glucopyranose.

Sehr wahrscheinlich tritt die ungesättigte Cyclitol-Einheit der Acarbose (5) mit dem Glucopyranosyl-Bindungszentrum der Saccharase in Wechselwirkung, wobei das axial angeordnete Stickstoffatom die Position des Glycosid-Sauerstoffatoms im Substratmolekül einnimmt. Die 4-Amino-4,6-didesoxyglucose-Einheit tritt mit dem sogenannten „Aglycon“-Bindungszentrum in Wechselwirkung. Diese Interpretation basiert auf den folgenden Gegebenheiten:

- Die ungesättigte Cyclitol-Einheit hat Halbsesselkonformation, wobei drei ihrer vier coplanaren C-Atome mit den Positionen C2—C1—O—C5 im Carbenium-Ion (vgl. Abb. 19) korrespondieren. Allerdings ist die strukturelle Übereinstimmung zwischen Cyclitol-Einheit und Carbenium-Ion nicht so vollkommen, als daß die Absättigung der Doppelbindung zu einem drastischen Wirkungsverlust führte.
- Von größerer Bedeutung für die starke Inhibitionswirkung ist der Ersatz der glycosidischen Sauerstoff-Funktion des Substrates durch die stärker basische NH-Funktion im Inhibitor. Der  $pK_a$ -Wert der NH-Gruppe in (5) beträgt etwa 5<sup>[96]</sup>. Demnach ist bei keinem der geprüften pH-Werte (5.85; 6.8; 7.45)<sup>[88]</sup> mit einer Protonierung zu rechnen. Da diese Gruppe dem glycosidischen Sauerstoff des Substratmoleküls entspricht, dürfte sie auch mit der gleichen Carboxygruppe des aktiven Zentrums in Wechselwirkung treten. Der  $pK_a$ -Wert jener Gruppe beträgt ca. 7.3<sup>[88]</sup>. Tatsächlich nimmt die Affinität der Acarbose (5) bei Deprotonierung jener Carboxygruppe ab ( $K_i$  bei pH 6.8 =  $4.7 \cdot 10^{-7}$  mol/L gegenüber  $1.0 \cdot 10^{-6}$  mol/L bei pH 7.45)<sup>[88]</sup>.
- Weiterhin ist für die hohe Affinität zum Enzym auch eine starke Wechselwirkung des 4-Amino-4,6-didesoxyglucoserestes in (5) mit dem „Aglycon“-Bindungszentrum wichtig, denn Valienamin (16) ist ein um zwei bis drei Zehnerpotenzen schwächerer Saccharase-Inhibitor als Acarbose. Außerdem trägt die  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -Verknüpfung von Cyclitol-Einheit und Aminozucker zur Spezifität der Hemmung bei; so inhibiert Acarbose in nennenswertem Maße weder die eng mit der Saccharase-Untereinheit verwandte Isomaltase-Untereinheit noch die ähnlich wirkende  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln.

Alle diese Befunde fügen sich somit weitgehend in die Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der Saccharase ein und erklären, daß das Pseudodisaccharid-„core“ der einzelnen Glieder der homologen Acarbose-Reihe für die Hemmwirkung essentiell ist.

Nach den in Abschnitt 5 erwähnten Ergebnissen eigener Untersuchungen mit Hydrierungsprodukten der Acarbose (5)<sup>[73]</sup> sowie nach den von japanischen Autoren beschriebene-

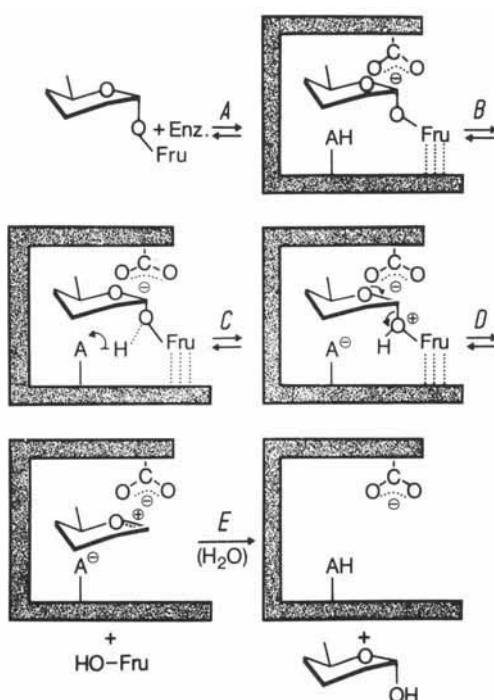
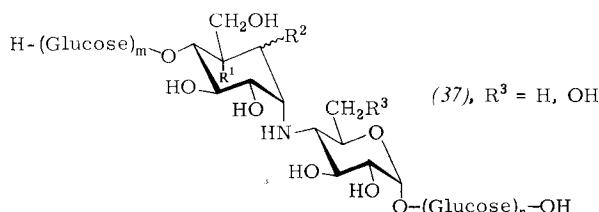


Abb. 19. Wirkungsmechanismus der enzymatischen Hydrolyse von Saccharose durch intestinale Saccharase nach Cogoli und Semenza [92].

nen Eigenschaften von gesättigten, der Acarbose (5) verwandten mikrobiellen Inhibitoren<sup>[72b]</sup> dürfte die Doppelbindung nur in quantitativer Hinsicht von Bedeutung sein. Es ergibt sich damit unter Berücksichtigung weiterer Patentliteratur<sup>[68]</sup> für diese pseudooligosaccharidischen  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren die allgemeine Strukturformel (37), in der entweder  $R^1 = H$  und  $R^2 = H$  oder OH ist, oder in der  $R^1$  und  $R^2$  eine Doppelbindung bilden.



Im Gegensatz zur Acarbose (5) ähneln Nojirimycin (35) und 1-Desoxynojirimycin (36) in ihrer Molekülgöße und in gewissem Umfang auch in ihrer Struktur der D-Glucose. Sie hemmen eine ganze Reihe von sowohl  $\alpha$ -Glucosidasen (einschließlich Dünndarm-Isomaltase<sup>[\*]</sup>, vgl. Tabelle 10) als auch  $\beta$ -Glucosidasen<sup>[59, 60, 97, 98]</sup>. Sie dürften mit dem Teil des aktiven Zentrums der Saccharase reagieren, der das „Glucopyranosid-Subzentrum“ darstellt, und weder mit dem „Agllycon-Subzentrum“ noch mit der Carboxygruppe, die den glycosidischen Sauerstoff protoniert ( $pK_a$  ca. 7.3). Dementsprechend sind die  $K_i$ -Werte für beide Substanzen bei den pH-Werten 6.8 und 7.45 nahezu gleich<sup>[88]</sup>. Anhand der vorhandenen Daten ist der Wirkungsmechanismus von Nojirimycin (35) und Desoxynojirimycin (36) nicht so einfach zu erklären wie der von Acarbose (5). Nach eingehender Diskussion aller Gegebenheiten, unter Einbeziehung der mit anderen, schwächer wirkenden Saccharase-Inhibitoren (z. B. D-Glucono-1,5-lacton und D-Glucono-1,5-lactam) gewonnenen Erkenntnisse und unter Heranziehung möglicher Hypothesen kommen Semenza et al.<sup>[88]</sup> zu dem Schluß, daß (35) und (36) in nicht protonierter Form an das aktive Zentrum gebunden und anschließend protoniert werden. Für (36) z. B. ergibt sich dann das in Abbildung 20 schematisch wiedergegebene Bild.

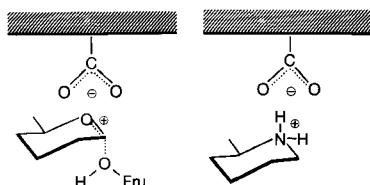


Abb. 20. Bindung des protonierten 1-Desoxynojirimycin-Moleküls (36) (schematisch) an eine Carboxylatgruppe des aktiven Zentrums der Saccharase im Vergleich zum Oxonium/Carbenium-Ion-Übergangszustand des Substrats (siehe auch Abb. 19).

## 12. Pharmakologische und klinische Aspekte

Diätetische Maßnahmen sind seit langem eine Basistherapie von Stoffwechselkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas oder Hyperlipoproteinämie, Typ IV. Diese Maßnahmen verlangen vom Patienten grundsätzlich eine reduzierte Aufnahme von Kohlenhydraten und eine Verteilung der Mahlzeiten auf möglichst viele kleine Portio-

[\*]  $K_i$  für 1-Desoxynojirimycin (36):  $4.76 \cdot 10^{-8}$  mol/L bei pH 6.25 (Schweinendünndarm-Isomaltase, Methode: „Dixon plot“).

nen über den ganzen Tag. Auf diese Weise lassen sich in vielen Fällen Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Hypertriglyceridämie (erhöhte Triglycerid-Werte im Blut) vermeiden. In der täglichen Praxis stehen jedoch der Einhaltung derartiger Maßnahmen häufig äußere Umstände und innere Widerstände entgegen<sup>[45]</sup>.

Kohlenhydrate sind ein Hauptbestandteil der menschlichen Nahrung, und von ihnen bestehen 80–90% aus Stärke und Saccharose<sup>[99]</sup>. Im allgemeinen müssen täglich über 250 g Di- und Polysaccharide, wie in den Abschnitten 2 und 3 näher ausgeführt, im Intestinaltrakt enzymatisch gespalten werden, ehe sie vom Organismus verwertet werden können. Nach einem bereits in der Einleitung erwähnten Konzept von Puls<sup>[19, 20, 45]</sup> sollte eine medikamentöse Beeinflussung der intestinalen Kohlenhydratverdauung mit geeigneten  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren ein gangbarer Weg sein, um regulierend und retardierend in die Kohlenhydratverdauung einzugreifen, die Resorptionsrate der Monosaccharide zu steuern und auf diese Weise den Intermediärstoffwechsel der Kohlenhydrate zu beeinflussen. Dieses Konzept konnte durch die Ergebnisse experimenteller und klinisch-pharmakologischer Untersuchungen mit einem  $\alpha$ -Amylase-Inhibitorpräparat (BAY d 7791), einem Protein aus Weizensamenmehl<sup>[17, 18]</sup>, gestützt werden<sup>[17, 19, 77]</sup>; das führte zur Suche nach wirksameren  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren. Die pseudooligosaccharidischen Inhibitoren der allgemeinen Formel (4) erwiesen sich als besonders geeignet. Die Ergebnisse von in-vivo-Versuchen an Ratten, die mit den Homologen erzielt wurden, sind in

Tabelle 13. Hemmung der  $\alpha$ -Glucosidasen-Aktivität in vitro und in vivo durch Acarbose (5) und Homologe der allgemeinen Formel (4) [45].

Komponente	in vitro 50% Hemmung von 100 mU $\alpha$ -Amylase [a] [ng]	in vivo ED <sub>50</sub> [b] bei Stärke- belastung [mg/kg Ratte]	in vitro 50% Hemmung von 10 mU Saccharase [a] [ng]	in vivo ED <sub>50</sub> [b] bei Saccharose- belastung [mg/kg Ratte]
2	855	1.1	560	1.0
3 (Acarbose)	680	1.5	74	1.1
4	1135	1.4	455	3.3
5	4.7	1.0	700	10.0
6	2.8	0.4	700	$\approx 25.5$
BAY e 4609	14.5	6.1	60000	$> 75.0$

[a] Vgl. Fußnote [b] in Tabelle 7. [b] ED<sub>50</sub> ist die Dosis, die notwendig ist, um den integrierten postprandialen Blutglucoseanstieg um 50% zu reduzieren [100].

Tabelle 13 den in-vitro-Inhibitionswerten bei  $\alpha$ -Amylase und Saccharase (siehe auch Tabelle 7) gegenübergestellt<sup>[43b, 45, 74, 77]</sup>.

Die in-vivo-Charakterisierung der Inhibitoren erfolgt durch Belastungstests an Ratten mit den Substraten Stärke und Saccharose. Nach Gabe einer definierten Menge an Kohlenhydrat wird die postprandiale Blutglucose-Konzentration zu mehreren Zeitpunkten bestimmt, graphisch aufgetragen und integriert, wobei die Blutglucose-Konzentration von mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung behandelten Ratten als Basislinie dient. Die in-vivo-Aktivität wird als ED<sub>50</sub>-Wert angegeben. Vergleicht man die Kenndaten der in-vivo-Aktivität im Saccharose-Belastungstest der ersten fünf Glieder der homologen Reihe sowie die der hochmolekularen Präparation BAY e 4609 mit den Daten der in-vitro-Aktivität der Saccharase-Inhibition, so fällt –

abgesehen von den im Augenblick noch nicht befriedigend erklärbaren Verhältnissen bei Komponente 2 (6) – eine gute Parallelität von in-vitro- und in-vivo-Aktivitäten auf (Tabelle 13).

Sowohl in vitro als auch in vivo ist Acarbose (5) die wirksamste Verbindung. Auffallend ist, daß laut Tabelle 13 die Komponenten 2–6 den Stärkeabbau in vivo in sehr ähnlichem Ausmaß hemmen, während die Unterschiede in der  $\alpha$ -Amylase-Inhibition in vitro beträchtlich sind (Abb. 16 und Tabelle 7). Daraus folgt, daß der Inhibitionstest in vitro mit reiner  $\alpha$ -Amylase als Enzym die Verhältnisse des intestinalen Stärkeabbaues in vivo nicht korrekt widerspiegelt. Wie bereits in Abschnitt 3 erwähnt, ist der intestinale Stärkeabbau ein komplexer Vorgang mit einer Vielzahl beteiligter Enzyme. Hinweise auf denkbare Mechanismen der in-vivo-Wirkung können der Tabelle 7 entnommen werden, nach der die Hemmung von Maltase, „Dextrinase“ und Glucoamylase durch die Komponenten 2–5, besonders aber durch Acarbose (5), beträchtlich ist. Wenn es möglich wird, den Anteil der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten an dem in-vivo-Abbau von Stärke zu Glucose zu bestimmen, läßt sich vielleicht auch der in-vivo-Wirkungsmechanismus der Acarbose und ihrer Homologen aufklären. Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, liegt die ED<sub>50</sub> für Acarbose (5) im Stärkebelastungstest bei 1.5 mg/kg Ratte; das ist eine Dosierung, die nur wenig höher als die im Saccharosebelastungstest ermittelte ED<sub>50</sub> liegt. Dieser Befund war unter anderem ausschlaggebend für die Auswahl von Acarbose für die klinische Prüfung und damit für ihre praktische Anwendung. Mit ihrem breiteren in-vivo-Hemmpektrum erwies sich Acarbose dem pharmakologisch<sup>[77]</sup> und klinisch<sup>[78]</sup> auch sehr eingehend untersuchten  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor-Präparat BAY e 4609 klar überlegen.

Acarbose hemmt nicht nur dosisabhängig den postprandialen Blutzuckeranstieg bei mit Stärke und/oder Saccharose belasteten Ratten, sondern dementsprechend auch die reaktive postprandiale Hyperinsulinämie<sup>[45, 100]</sup>. Therapiebezogene klinisch-pharmakologische Untersuchungen an gesunden Probanden führten zu ähnlichen Ergebnissen wie die oben beschriebenen Experimente an Ratten<sup>[45, 75, 100]</sup>.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Acarbose die Gewichtszunahme bei genetisch adipösen „Zucker“-Ratten, die eine Saccharose-enthaltende Diät erhielten, dosisabhängig vermindert, was auf eine verringerte Nahrungsaufnahme der behandelten Tiere zurückzuführen ist. Diese Tiere wiesen außerdem signifikant reduzierte Serumwerte an Triglyceriden und freien Fettsäuren auf. Diese Reduktion der Kohlenhydrat-induzierten Hyperlipoproteinämie wird auf eine Verminderung der überschließenden Sekretion Triglycerid-reicher Lipoproteine, d. h. der „VLDL-Fraktion“, aus der Leber zurückgeführt. Schließlich ergaben Analysen der Tierkörper (Karkassen) einen gegenüber Kontrolltieren verminderter Körperfettansatz bei unverändertem Proteinanteil<sup>[45, 100]</sup>.

Acarbose (5) wurde am eingehendsten, vor allem bei der Indikation Diabetes mellitus, klinisch geprüft; das Ergebnis zahlreicher Studien läßt sich wie folgt zusammenfassen<sup>[75, 76, 101]</sup>:

Bei insulinabhängigen Diabetikern läßt sich die Stoffwechselleage durch Acarbose deutlich verbessern, gemessen

an erniedrigten Blutglucosewerten und einer Reduzierung der Insulindosis. Insulin kann aber in Fällen eines Insulinmangels nicht durch Acarbose ersetzt werden. Bei nicht insulinabhängigen Diabetikern wird die Stoffwechselleage um so deutlicher verbessert, je länger das Präparat eingenommen wird. Bedingt durch den Wirkungsmechanismus von Acarbose kann es vorübergehend zu einer intestinalen Symptomatik (Diarrhoe, Blähungen und ähnliches) kommen, die aber in der Regel von den Patienten toleriert wird. Besonders bei länger andauernder Medikation kommt es zu einer Verminderung der Symptomatik. Gemessen an hämatologischen und klinisch-biochemischen Untersuchungen erwies sich Acarbose als objektiv sehr gut verträgliches Präparat. Damit ist Acarbose, die zur Zeit noch nicht im Handel ist, ein neues, in der Behandlung von Diabetes mellitus wirksames Präparat, das obendrein auch ein neuartiges therapeutisches Prinzip nutzt. Seine Wirksamkeit bei Hyperlipoproteinämie und Adipositas wird gegenwärtig klinisch geprüft.

Im Hinblick auf die Erschließung weiterer Indikationen für mikrobielle  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren wurden an Versuchspersonen in-vivo-Untersuchungen zur Hemmung des Stärkeabbaus in der Mundhöhle, der vorwiegend durch Speichelamylase bewirkt wird, durchgeführt<sup>[102]</sup>. Die Zugabe der  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor-Präparation BAY e 4609 (vgl. Abschnitt 5) zu der in diesen Experimenten verwendeten Stärke bewirkt eine Reduktion des oralen Stärkeabbaus. Telemetrische Messungen des nach der Stärkegabe zu beobachtenden rapiden pH-Abfalls in den durch Bakterien der Mundhöhle an den Zähnen gebildeten „Plaques“ ergaben einen verminderten pH-Abfall bei Anwendung des Amylase-Inhibitors. Dieser Effekt konnte bei Kombination von BAY e 4609 mit Acarbose noch verstärkt werden. Diese Befunde geben zumindest Anhaltspunkte für die mögliche Verminderung des kariogenen Potentials oral abgebauter Stärke durch mikrobielle  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren<sup>[102]</sup>.

Acarbose und die anderen in diesem Beitrag besprochenen  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren zeigen beispielhaft, daß durch Screening, das einen Bezug zur praktischen Anwendung hat, neue Wirkstoffe aus dem sicher noch längst nicht erschöpften Reservoir der mikrobiellen, sekundären Metaboliten gewonnen werden können.

*Wir danken Professor G. Semenza, Laboratorium für Biochemie der ETH Zürich, für wertvolle Diskussionen zum Wirkungsmechanismus der  $\alpha$ -Glucosidasen-Inhibitoren und für die freundliche Überlassung seines zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Arbeit noch nicht veröffentlichten Manuskriptes<sup>[88]</sup>. Ebenso danken wir Dr. J. J. Marshall, Miles Labs. Inc., Elkhart, Indiana (USA) für die Überlassung der in den Tabellen 8 und 9 aufgelisteten Daten aus einem zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit noch nicht veröffentlichten Manuskript<sup>[87]</sup>.*

Eingegangen am 19. Januar 1981 [A 372]

[1] H. Fritz, H. Tchesche: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, de Gruyter, Berlin 1971.

[2] H. Fritz, H. Tchesche, L. J. Greene, E. Truscheit: Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors, Springer, Berlin 1974.

- [3] Übersicht: *H. Tschesche*, Angew. Chem. 86, 21 (1974); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 13, 10 (1974).
- [4] Übersicht: *M. Laskowski, Jr., I. Kato*, Annu. Rev. Biochem. 49, 593 (1980).
- [5] *C. Fermi, L. Pernossi*, Z. Hyg. Infektionskr. 18, 83 (1894).
- [6] Zusammenstellung von *N. Heimburger, H. Haupt, H. G. Schwick* in [1], S. 1.
- [7] *T. Chrzaszcz, J. Janicki*, Biochem. Z. 260, 354 (1933); 264, 193 (1933).
- [8] *E. Kneen, R. M. Sandstedt*, J. Am. Chem. Soc. 65, 1247 (1943).
- [9] *E. Kneen, R. M. Sandstedt*, Arch. Biochem. 9, 235 (1946).
- [10] *D. E. Bowman*, Science 102, 358 (1945).
- [11] *A. Hernandez, W. G. Jaffé*, Acta Cient. Venez. 19, 183 (1968); *W. G. Jaffé, R. Moreno, V. Wallis*, Nutr. Rep. Int. 7, 169 (1973).
- [12] *J. J. Marshall, C. M. Lauda*, J. Biol. Chem. 250, 8030 (1975).
- [13] *J. R. Powers, J. R. Whitaker*, J. Food Biochem. 1, 217, 239 (1977).
- [14] *K.-H. Pick, G. Wöber*, Z. Physiol. Chem. 359, 1371, 1379 (1978); Prep. Biochem. 9, 293 (1979).
- [15] *M. N. Rao, K. S. Shupalekar, O. E. Sundaravalli*, Indian J. Biochem. 4, 185 (1967); 7, 241 (1970).
- [16] Übersichten: a) *J. J. Marshall*: Physiological Effects of Food Carbohydrates in ACS Symp. Ser., Vol. 15, Am. Chem. Soc., Washington 1975, S. 244ff.; b) *V. Buonocore, T. Petrucci, V. Silano*, Phytochemistry 16, 811 (1977); c) Proc. 3. Int. Congr. Obesity, Satellite Symp. Nr. 7, Siena (Italien), 13.–15. 10. 1980; Regulators of Intestinal Absorption in Obesity, Diabetes and Nutrition; d) *V. Buonocore, E. Poerio, V. Silano* in [16c], Vol. 1, S. 87; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 429 (1980). Neuere Arbeiten: e) *P. E. Granum, J. R. Whitaker*, J. Food Biochem. 1, 385 (1977); f) *P. E. Granum*, ibid. 2, 103 (1978); g) *M. Richardson, N. Kashlan* in [16c], Vol. 1, S. 103; h) *C. M. O'Connor, M. D. O'Donnell, K. F. McGeeney* in [16c], Vol. 2, S. 119; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 443 (1980); i) *C. M. O'Connor, K. F. McGeeney*, Biochim. Biophys. Acta 658, 387, 397 (1981).
- [17] *D. D. Schmidt, W. Puls*, DOS 2003934 (1971) (dtsch. Priorität 26. Jan. 1970), Bayer AG.
- [18] *E. Truscheit, D. D. Schmidt, A. Arens, H. Lange, W. Wingender* in [16c], Vol. 2, S. 157; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 451 (1980).
- [19] *W. Puls, U. Keup*, Diabetologia 9, 97 (1973).
- [20] *W. Puls*, Habilitationschrift, Universität Düsseldorf 1980.
- [21] *W. Frommer, W. Puls, D. Schäfer, D. D. Schmidt*, DOS 2064092 (1972) (dtsch. Priorität 28. Dez. 1970), Bayer AG.
- [22] *W. Frommer, B. Junge, U. Keup, L. Müller, W. Puls, D. D. Schmidt*, DOS 2347782 (1975) (dtsch. Priorität 22. Sept. 1973), Bayer AG.
- [23] *D. D. Schmidt, W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, E. Truscheit, D. Schäfer*, Naturwissenschaften 64, 535 (1977).
- [24] *H. Umezawa*: Enzyme Inhibitors of Microbial Origin, University Park Press, Baltimore 1972.
- [25] *W. Frommer, B. Junge, L. Müller, D. D. Schmidt, E. Truscheit*, Planta Med. (J. Med. Plant Res.) 35, 195 (1979).
- [26] *W. Wingender* in [2], S. 548; *T. Aoyagi, H. Umezawa* in *E. Reich, D. B. Rijkin, E. Shaw*: Proteases and Biological Control, Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation 2, 429 (1975); *H. Umezawa, T. Takita, T. Shiba*: Bioactive Peptides Produced by Microorganisms, Wiley, New York 1978; *T. Aoyagi, H. Umezawa* in *I.J. Vitale, V. Simeon*: Industrial and Clinical Enzymology, FEBS Symp. 61, 89 (1980).
- [27] *W. J. Whelan*, Biochem. J. 122, 609 (1971).
- [28] *D. J. Manners*, Essays Biochem. 10, 37 (1974).
- [29] *J. J. Marshall*, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30, 257 (1974).
- [30] *Z. Gunja-Smith, J. J. Marshall, C. Mercier, E. E. Smith, W. J. Whelan*, FEBS Lett. 12, 101 (1970).
- [31] *J. W. Mayo, D. M. Carlson*, Arch. Biochem. Biophys. 163, 498 (1974).
- [32] *P. Cozzzone, G. Marchis-Mouren*, Biochim. Biophys. Acta 257, 222 (1972).
- [33] *P. Bernfeld*, Methods Enzymol. 1, 149 (1955).
- [34] *R. Ruyssen, A. Lawwers*: Pharmaceutical Enzymes – Properties and Assay Methods, S. 66, Story-Scientia, Gent 1978.
- [35] *K. Fossum, J. R. Whitaker*, J. Nutr. 104, 930 (1974).
- [36] *J. J. Marshall, C. M. Lauda*, Stärke 27, 274 (1975).
- [37] *G. Semenza*, Enzymes Biol. Membr. 3 (Membrane Transport), 349 (1976).
- [38] *J. K. Kelly, D. H. Alpers*, Biochim. Biophys. Acta 315, 113 (1973).
- [39] *K. A. Conklin, K. M. Yamashiro, G. M. Gray*, J. Biol. Chem. 250, 5735 (1975).
- [40] *J. J. Marshall, C. M. Sturgeon, W. J. Whelan*, Anal. Biochem. 82, 435 (1977).
- [41] *G. Semenza*, Carbohydr. Metab. Its Disord., Vol. III, Academic Press, London 1981, im Druck.
- [42] *A. Dahlquist*, Enzymol. Biol. Clin. 11, 52 (1970).
- [43] a) *U. Brodbeck*: Enzyme Inhibitors (Proc. Meet., Basel, 20.–21. 03. 1980), Verlag Chemie, Weinheim 1980; b) *L. Müller, B. Junge, W. Frommer, D. D. Schmidt, E. Truscheit* in [43a], S. 106.
- [44] *D. D. Schmidt, W. Frommer, L. Müller, E. Truscheit*, Naturwissenschaften 66, 584 (1979).
- [45] *W. Puls, U. Keup, H. P. Krause, L. Müller, D. D. Schmidt, G. Thomas, E. Truscheit*, Front. Horm. Res. 7, 235 (1980).
- [46] *D. D. Schmidt, W. Frommer, B. Junge, L. Müller, E. Truscheit, W. Wingender* in [16c], Vol. 1, S. 203; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 449 (1980).
- [47] *S. Ueda, Y. Koba*, US-Pat. 3806421 (1974) (jap. Priorität 31. Mai 1971), Hayashibara Biochemical Laboratories; Agric. Biol. Chem. 37, 2025 (1973).
- [48] *Y. Koba, M. Najima, S. Ueda*, Agric. Biol. Chem. 40, 1167 (1976).
- [49] *S. Ueda, Y. Koba, H. Chaen*, Carbohydr. Res. 61, 253 (1978).
- [50] *H. Chaen, S. Ueda*, Agric. Biol. Chem. 43, 2265 (1979).
- [51] *S. Murao*, US-Pat. 4010258 (1977) (jap. Priorität 15. März 1974), Ajinomoto Co., Inc. und Eisai Co., Ltd.; *S. Murao, K. Ohyama*, Agric. Biol. Chem. 39, 2271 (1975).
- [52] *S. Murao, K. Ohyama, S. Ogura*, Agric. Biol. Chem. 41, 919 (1977); *K. Ohyama, S. Murao*, ibid. 41, 2221 (1977).
- [53] *S. Murao, K. Ohyama*, Agric. Biol. Chem. 43, 679 (1979).
- [54] *H. Goto, T. Inukei, M. Amano*, Japanische Offenlegungsschrift 7577594 (1975) (jap. Priorität 20. Nov. 1973), Amano Pharmaceutical Co., Ltd.
- [55] *W. Frommer, L. Müller, D. D. Schmidt, W. Puls, H. P. Krause, U. Heber*, DOS 2658563 (1978) (dtsch. Priorität 23. Dez. 1976).
- [56] *S. Inouye, T. Tsuruoka, T. Niida*, J. Antibiot. 19, 288 (1966).
- [57] *H. Paulsen, I. Sangster, K. Heyns*, Chem. Ber. 100, 802 (1967).
- [58] *S. Inouye, T. Tsuruoka, T. Ito, T. Niida*, Tetrahedron 24, 2125 (1968).
- [59] *T. Niida, S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze, T. Niida*, Agric. Biol. Chem. 34, 966 (1970).
- [60] *E. T. Reese, F. W. Parrish, M. Ettlinger*, Carbohydr. Res. 18, 381 (1971).
- [61] *H. Murai, K. Ohata, H. Enomoto, Y. Yoshikuni, T. Kono, M. Yagi*, DOS 2656602 (1977) (jap. Priorität 29. Dez. 1975), Nippon Shinyaku Co., Ltd.
- [62] *S. Matsumura, H. Enomoto, Y. Aoyagi, Y. Ezure, Y. Yoshikuni, M. Yagi*, DOS 2850467 (1979) (jap. Priorität 21. Nov. 1977), Nippon Shinyaku Co., Ltd.
- [63] *S. Murao, S. Miyata*, Agric. Biol. Chem. 44, 219 (1980).
- [64] *K. Ueda, S. Gochyo*, Japanische Offenlegungsschrift 51-54990 (1976) (jap. Priorität 5. Nov. 1974), Ajinomoto Co., Ltd.
- [65] *A. Belloc, J. Florent, J. Lunel, D. Mancy, J.-C. Palla*, DOS 2702417 (1977) (franz. Priorität 22. Jan. 1976), Rhône-Poulenc Industries.
- [66] *N. Oeding, W. Pfaff, L. Vértesy, H.-L. Weidmüller*, DOS 2701890 (1978) (dtsch. Priorität 19. Jan. 1977), Hoechst AG.
- [67] a) *L. Vértesy, V. Oeding, R. Bender, G. Nesemann, D. Sukatsch, K. Zepf* in [16c], Vol. 2, S. 269; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 452 (1980); b) *H. Aschauer, L. Vértesy, G. Braunitzer*, Z. Physiol. Chem. 362, 465 (1981).
- [68] *M. Otani, T. Saito, S. Satoi, J. Mizoguchi, N. Muto*, DOS 2855409 (1979) (jap. Priorität 28. Dez. 1977), Toyo Jozo Co., Ltd.
- [69] *K. Kangouri, S. Namiki, T. Nagate, K. Sugita, S. Omura*, US-Pat. 4197292 (1980) (jap. Priorität 10. Febr. 1978), Taisho Pharmaceutical Co.
- [70] *Y. Suhara, K. Yokose, K. Watanabe, K. Ogawa*, DOS 2905649 (1979) (brit. Priorität 14. Febr. 1978), Hoffmann-La Roche und Co. AG.
- [71] *S. Murao, A. Goto, Y. Matsui, K. Ohyama*, Agric. Biol. Chem. 44, 1679 (1980).
- [72] a) *S. Murao, A. Goto, M. Arai*, Agric. Biol. Chem. 44, 1683 (1980); b) *S. Omoto, J. Itoh, T. Niwa, T. Shomura, S. Niizato, S. Inouye*, DOS 3035193 A1 (1981) (jap. Priorität 19. Sept. 1979), Meiji Seika Kaisha Ltd.
- [73] a) *B. Junge, H. Böshagen, J. Stoltefuß, L. Müller* in [43a], S. 123; b) *B. Junge, H. Böshagen, F. Heiker, L. Müller, J. Stoltefuß*: Vortrag, Fall Meet. Am. Chem. Soc., New York 1981.
- [74] *W. Puls, U. Keup, H. P. Krause, G. Thomas* in [16c], Vol. 1, S. 231; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 458 (1980).
- [75] *K. Schöffling, I. Hillebrand, P. Berchtold*, Front. Horm. Res. 7, 248 (1980).
- [76] *P. Berchtold, I. Hillebrand, K. Boehme, R. Aubell, L. Nagel, H. Schulz* in [16c], Vol. 1, S. 261; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 426 (1980).
- [77] *W. Puls, U. Keup, H. P. Krause, K. O'Dea, R. Sitt* in [16c], Vol. 1, S. 153; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 458 (1980).
- [78] *P. Berchtold, N. H. Kiesslbach* in [16c], Vol. 1, S. 181; Abstract siehe: La Clinica Dietologica 7, 426 (1980).
- [79] *W. Frommer, B. Junge, U. Keup, L. Müller, W. Puls, D. D. Schmidt*, DOS 2347798 (1975) (dtsch. Priorität 22. Sept. 1973), Bayer AG.
- [80] *W. Frommer, W. Puls, D. D. Schmidt*, DOS 2209832 (1973) (dtsch. Priorität 1. März 1972), Bayer AG.
- [81] *S. Horii, T. Iwasa, E. Mizuta, Y. Kameda*, J. Antibiot. 24, 59 (1971).
- [82] Revidierte Struktur von Validamycin A: *T. Suami, S. Ogawa, N. Chida*, J. Antibiot. 33, 98 (1980).
- [83] *S. Horii, Y. Kameda*, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1972, 747.
- [84] a) *Y. Kameda, S. Horii*, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1972, 746; b) *Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshikawa, K. Matsui*, J. Antibiot. 33, 1575 (1980).
- [85] *W. Frommer, W. Puls, D. D. Schmidt*, DOS 2209833 (1973) (dtsch. Priorität 1. März 1972), Bayer AG.

- [86] W. Frommer, W. Puls, D. D. Schmidt, DOS 2209834 (1973) (dtsch. Priorität 1. März 1972), Bayer AG.
- [87] H. Hidaka, T. Takaya, J. J. Marshall, J. Jpn. Starch Sci. 27, 114 (1980).
- [88] G. Hanozet, H.-P. Pircher, P. Vanni, B. Oesch, G. Semenza, J. Biol. Chem. 256, 3703 (1981).
- [89] H. Sigrist, P. Ronner, G. Semenza, Biochim. Biophys. Acta 406, 433 (1975).
- [90] W. F. Caspary, Lancet 1978, 1231.
- [91] W. F. Caspary, S. Graf, Res. Exp. Med. 175, 1 (1979).
- [92] A. Cogoli, G. Semenza, J. Biol. Chem. 250, 7802 (1975).
- [93] G. Semenza, A.-K. von Balthazar, Eur. J. Biochem. 41, 149 (1974).
- [94] H. Braun, A. Cogoli, G. Semenza, Eur. J. Biochem. 52, 475 (1975).
- [95] A. Quaroni, E. Gershon, G. Semenza, J. Biol. Chem. 249, 6424 (1974).
- [96] Nach Untersuchungen von W. Gau, Bayer AG, Wuppertal, persönliche Mitteilung.
- [97] A. K. Grover, R. J. Cusley, Biochim. Biophys. Acta 482, 109 (1977).
- [98] G. Legler, K.-R. Roeser, H.-K. Illig, Eur. J. Biochem. 101, 85 (1979).
- [99] Ernährungsbericht 1976, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Frankfurt 1976.
- [100] W. Puls, U. Keup, H. P. Krause, G. Thomas, F. Hoffmeister, Naturwissenschaften 64, 536 (1977).
- [101] I. Hillebrand, P. Berchtold in [43a], S. 153.
- [102] J. E. Mörmann, H. R. Mühlmann, Lebensm. Wiss. Technol. 14, 166 (1981).

## 4-Aryldihydropyridine, eine neue Klasse hochwirksamer Calcium-Antagonisten

Von Friedrich Bossert, Horst Meyer und Egbert Wehinger<sup>[\*]</sup>

*Professor Herbert Grünwald zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die von Hantzsch vor nahezu hundert Jahren synthetisierten Aryldihydropyridine erwiesen sich in jüngerer Zeit als hochwirksame und gut verträgliche Calcium-Antagonisten. Paradebeispiel ist der bereits therapeutisch angewandte 1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(*o*-nitrophenyl)pyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (Nifedipine). Dieser Stoff setzt die Anfallshäufigkeit bei Angina pectoris herab und senkt den Blutdruck. Die Entdeckung der therapeutischen Wirksamkeit dieser Stoffklasse initiierte erneute Untersuchungen der Hantzsch-Kondensation sowie die Synthese zahlreicher 4-Aryldihydropyridine und verwandter Verbindungen. Aus ihren biologischen Daten lassen sich qualitative und quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten.

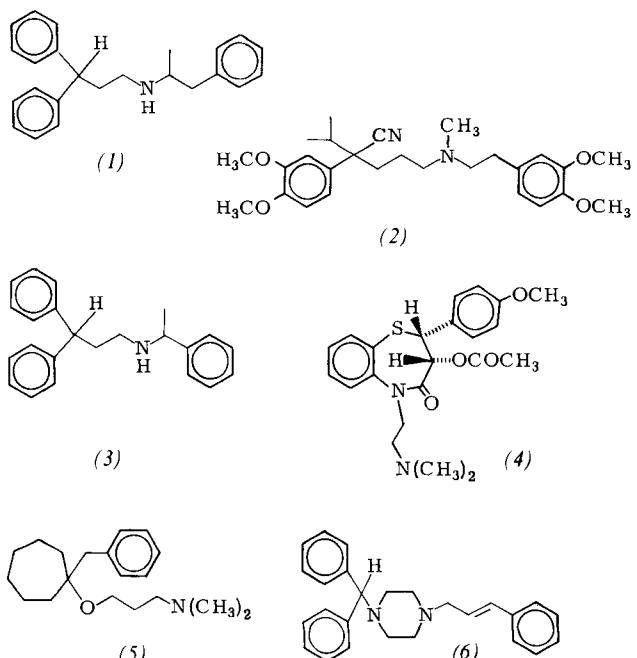
### 1. Einleitung: Was ist ein Calcium-Antagonist?

Calcium-Antagonisten sind Wirkstoffe, die den transmembranären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen kontraktiler Systeme verringern. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Myofibrillen-ATPase wandelt daraufhin im kontraktilen System weniger in ATP gespeicherte chemische Energie in mechanische Energie um. Durch die Herabsetzung des ATP-Verbrauchs wird der Sauerstoffbedarf des schlagenden Herzens gesenkt. Der kontraktile Grundtonus der Herzkrankgefäß und der peripheren Gefäße nimmt ebenfalls ab. Die Calcium-Antagonisten haben demnach drei Grundwirkungen<sup>[1,2]</sup>:

- 1) sie dämpfen den myocardialen Tätigkeitsstoffwechsel,
- 2) sie steigern die Durchblutung der Herzkrankgefäß,
- 3) sie verringern den Strömungswiderstand der Arterien.

Wegen ihrer gefäßerweiternden Wirkung werden Calcium-Antagonisten klinisch insbesondere zur Therapie von Sauerstoffmangelzuständen des Herzens verwendet, wie

beispielsweise der Angina pectoris. Da sie den Strömungswiderstand in den Arterien verringern, sind Calcium-Antagonisten bei geeignetem pharmakologischen Profil auch zur Behandlung des Bluthochdrucks von Interesse<sup>[3,4,5]</sup>.



[\*] Dr. H. Meyer [+], Dr. F. Bossert, Dr. E. Wehinger  
Chemisch-wissenschaftliches Labor Pharma der Bayer AG  
Postfach 101709, D-5600 Wuppertal 1

[+] Korrespondenzautor.