

104.45 (s; C_4Me_5), 10.26 (s; C_2Me_5); ^{103}Rh -NMR (12.6 MHz, CD_2Cl_2 , 23 °C, Rh (Metall)): δ = +1345.

Eingegangen am 29. März 1994 [Z 6812]

- [1] A. Müller, B. Krebs, *Sulfur, Its Significance for Chemistry for the Geo-, Bio-, and Cosmospere and Technology*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- [2] M. R. DuBois, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1; C. Bianchini, C. Mealli, A. Meli, M. Sabat, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 4617.
- [3] Y. Ozawa, A. Vázquez de Miguel, K. Isobe, *J. Organomet. Chem.* **1992**, 433, 183.
- [4] a) K. Raghavachari, C. M. Rohlfing, J. S. Binkley, *J. Chem. Phys.* **1990**, 93, 5862; b) G. D. Brabson, Z. Mielke, L. Andrews, *ibid.* **1991**, 95, 79.
- [5] Der Kristall und die Strukturdaten von **2b** haben eine bessere Qualität als die von **2a**: $CH_2Cl_2 \cdot 4H_2O$. Kristallstrukturanalyse von **2b** ($C_{44}H_{68}B_2F_8Rh_4S_4$): schwarze Kristalle, Kristallgröße $0.38 \times 0.32 \times 0.18 \text{ mm}^3$, monoklin, a = 21.536(3), b = 9.159(1), c = 12.916(2) Å, β = 100.46(1)°, V = 2505.3(7) Å³, Raumgruppe $P2_1/a$ (Nr. 14), Z = 2, $\rho_{\text{ber.}}$ = 1.737 g cm⁻³. Mit einem Rigaku-AFC-5-Diffraktometer wurden bei 296 K ($Mo_{K\alpha}$ -Strahlung, λ = 0.71073 Å) die Intensitäten von 6372 Reflexe gemessen, davon 6116 unabhängige (θ -2 θ -Messung mit $2\theta < 55^\circ$). Lorentz- und Polarisationskorrektur der Rohdaten, Absorptionskorrektur nach der numerischen Integrationsmethode nach Gauss ($\mu(Mo_{K\alpha})$: 1.495 mm⁻¹, T_{max} : 0.888 bzw. 0.777) und Strukturlösung mit der Patterson-Methode (SHELXS-86). Insgesamt wurden 416 Parameter verfeinert. Die Lageparameter aller Nicht-Wasserstoffatome konnten anisotrop und die Wasserstoffatome isotrop mit einer Blockdiagonalen-kleinste-Fehlerquadrat-Technik mit UNICS III bis R = 0.027 und R_w = 0.041 gegen $|F|$ für 4798 Reflexe mit $F > 3.0 \sigma(F)$ verfeinert werden. Restelektronendichte: ($\Delta\rho$)_{min} = -0.51 und ($\Delta\rho$)_{max} = +0.75 e Å⁻³. Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen von **2a** · $CH_2Cl_2 \cdot 4H_2O$ und **2b** können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-58278 angefordert werden.
- [6] B. Meyer, *Chem. Rev.* **1976**, 76, 367.
- [7] G. Winnewisser, H. Winnewisser, W. Gordy, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 3465.
- [8] a) J. Amarasekera, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *Inorg. Chem.* **1987**, 26, 3328; b) A. Müller, W. Jaegermann, J. H. Enemark, *Coord. Chem. Rev.* **1982**, 46, 245.
- [9] C. G. Davies, R. J. Gillespie, J. J. Park, J. Passmore, *Inorg. Chem.* **1971**, 10, 2781.
- [10] J. Amarasekera, T. B. Rauchfuss, A. L. Rheingold, *Inorg. Chem.* **1987**, 26, 2017.
- [11] K. Isobe, A. Vázquez de Miguel, P. M. Bailey, S. Okeya, P. M. Maitlis, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1983**, 1441.
- [12] a) C. Berlin, T. Makani, J. Rozière, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 118; b) M. J. Collins, R. J. Gillespie, J. W. Kolis, J. F. Sawyer, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 2057.
- [13] A. M. Mehl, K. Morokuma, K. Isobe, *Inorg. Chem.*, eingereicht.
- [14] J. Martinez, H. Adams, N. A. Bailey, P. M. Maitlis, *J. Organomet. Chem.* **1991**, 405, 393.
- [15] J. Amarasekera, T. B. Rauchfuss, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 3875.

Der Trehalaseinhibitor Salbostatin, ein neuartiger Metabolit aus *Streptomyces albus*, ATCC 21838

László Vértesy*, Hans-Wolfram Fehlhaber und Arno Schulz

Obwohl Mikroorganismen-Kulturen eine überaus reiche Quelle für die verschiedenartigsten Sekundärmetaboliten sind, gibt es bislang nur wenige systematische Untersuchungen über die Stoffwechselprodukte eines bestimmten Organismus. Üblicherweise werden nur solche Verbindungen isoliert und charakterisiert, die auf gezielt eingesetzte biologische oder biochemische Leittests ansprechen. Darüber hinaus wurde in jüngerer Zeit das

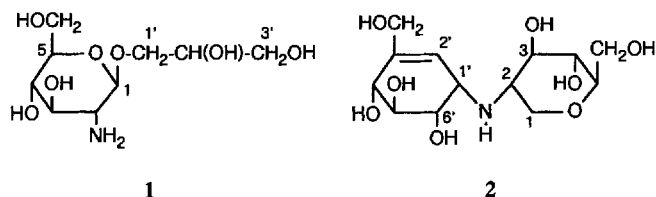
[*] Dr. L. Vértesy, Dr. H.-W. Fehlhaber
Allgemeine Pharma Forschung der Hoechst AG
D-65926 Frankfurt am Main
Telefax: Int. + 69/305-16354
Dr. A. Schulz
Forschung Biochemie der AgrEvo, Frankfurt am Main

sogenannte chemische Screening durchgeführt^[1], bei dem aber auch eine willkürliche Metabolitenauswahl stattfindet.

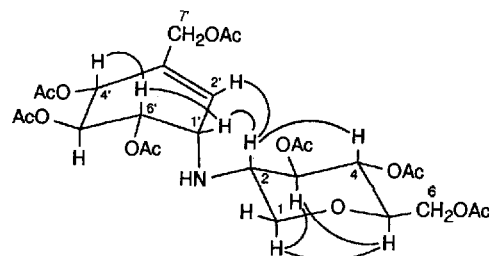
Hochleistungsmutanten von *Streptomyces albus*, ATCC 21838, werden zur Produktion des Polyetherantibiotikums Salinomycin^[2], eines Kokzidiostaticums, verwendet. Aufgrund der guten spezifischen Ausbeuten werden Futtermittelantibiotica technisch häufig nicht in reiner Form, sondern als getrocknetes Fermentationsmaterial – nach Prüfung der Verträglichkeit – direkt eingesetzt. Um Angaben über die Inhaltsstoffe zu gewinnen und um einen tieferen Einblick in den Sekundärstoffwechsel dieses Stamms zu erhalten, untersuchten wir die Kulturflüssigkeit einer Langzeitfermentation (zwölf Tage) eines Salinomycin-überproduzenten, die im Submersverfahren auf nährstoffreichem, komplexem Medium durchgeführt worden war. Im Butanolextrakt wurden neben Salinomycin und seinen Nebenkomponten^[2] geringe Mengen an $\Delta^{22(29)}$ -Hopan und einigen anderen Hopanoiden identifiziert. Auch das Antibiotikum Elaiophyllin^[3] wurde in einer Konzentration von weniger als 0.01 % des Trockenprodukts nachgewiesen, das vom Wildstamm ATCC 21838 in Mengen bis über 3 % gebildet wird.

Die nicht extrahierbaren Anteile wurden mit einem Ionenaustauscher getrennt: die Neutralfraktion enthielt hauptsächlich α,α' -Trehalose; aus der Basenfraktion konnten neben Nucleinbasen, vorwiegend Cytidin, zwei neue Naturstoffe isoliert werden. Der eine davon wurde aufgrund der NMR-Daten und der massenspektrometrischen Fragmentierung seines Peracetylderivats als 2',3'-Dihydroxypropyl-(2-amino-2-desoxy)- β -D-glucopyranosid **1** identifiziert. Die physiologische Bedeutung von **1** ist unklar. Kürzlich wurde ein Kapselbiopolymer von *Actinobacillus pleuropneumoniae* beschrieben, das als Untereinheit das phosphorylierte N-Acetylderivat von **1** enthält^[4]; synthetisch hergestellte Fettsäureacylierungsprodukte von **1** zeigten immunologische Wirkungen^[4b].

Für die Hauptkomponente der Basenfraktion, die in einer Konzentration von 1 mg L⁻¹ Kulturlösung vorkommt, wurde die Struktur **2** ermittelt. Dazu wurden die NMR-Spektren von



2 und seines Peracetylderivats **2'** (Schema 1) mit H,H-Korrelations-NMR-Spektroskopie komplett analysiert (Tabelle 1) sowie selektive NOE-Messungen (siehe Schema 1) und hochauflösende Massenspektrometrie herangezogen. Wir haben diesem ungewöhnlichen Pseudodisaccharid, bestehend aus Valienamin



Schema 1. Struktur des Peracetylderivats **2'**. Die Bogen kennzeichnen die Protonen, die zu positiven NOEs führen.

Tabelle 1. ^1H -NMR-Daten von Salbostatin **2** und dem Peracetylderivat **2'**.

Proton	δ	2 in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ Muster (J/Hz)	δ	2' in CDCl_3 Muster (J/Hz)
1- H_{ax}	2.92	dd (11, 11)	3.13	dd (11, 11)
1- H_{eq}	3.87	dd (4.6, 11)	4.07	dd (5, 11)
2-H	2.59	ddd (4.6, 10, 11)	2.88	ddd (5, 9.5, 11)
3-H			4.86	dd (9.5, 9.5)
4-H	3.01–3.06	m	4.93	dd (9.5, 9.5)
5-H			3.53	ddd (2, 5, 9.5)
6- H_a	3.39	dd (5.8, 11.5)	4.09	dd (2, 12)
6- H_b	3.64	dd (5.6, 11.5)	4.18	dd (5, 12)
1'-H	3.17	dd (3, 5)	3.64	dd (5, 5)
2'-H	5.86	d (3.2)	5.86	d (5)
4'-H	3.69	d (5)	5.51	d (6.5)
5'-H	3.42	dd (5, 9)	5.46	dd (6.5, 10)
6'-H	3.30	dd (5, 9)	4.96	dd (4, 10)
7'- H_a	3.94	d (14)	4.36	d (13)
7'- H_b	4.00	d (14)	4.62	d (13)

und dem als Naturstoff bisher nicht bekannten 2-Amino-1,5-anhydro-2-desoxyglucitol, den Namen Salbostatin gegeben^[5]. Es zeigt die spezifische Drehung $[\alpha]_D = +115$ und sollte daher, unter Berücksichtigung der Drehwerte von Valienamin (+48.6)^[6a]

und des mit dem zweiten Molekülteil isosteren 1,5-Anhydroglucitols **3** (+42.3)^[6b], die in **2** angegebene D-Konfiguration haben.

Das 1,5-Anhydroglucitol **3** ist zwar in mehreren Organismen aufgefunden worden^[7]. Hinweise auf die Funktion dieser Verbindung fehlen jedoch. Valienamin ist bekannt als Bestandteil der Aminoglycosidantibiotica vom Validamycin-Typ^[8a] sowie von α -Glucosidaseinhibitoren. Letztere sind aufgrund ihrer Hemmwirkung auf intestinale Enzyme von pharmazeutischem Interesse^[8b].

Salbostatin **2** ist antibiotisch nicht aktiv; die Enzyme Saccharase und Maltase (EC 3.2.1.26, EC 3.2.1.20, aus Schweinedünndarm-Mucosa) werden nicht, die Aldosereduktase (EC 1.1.1.21, aus Rattenleber) schwach gehemmt ($\text{IC}_{50} = 0.68 \text{ mM L}^{-1}$)^[9]. Es ist jedoch ein effektiver Hemmer der Trehalase (EC 3.2.1.28, aus Schweinenieren), mit einer Inhibitorkonstante von $K_i = 1.8 \times 10^{-7} \text{ M}$. Die Hemmung ist kompetitiv bezüglich Trehalase. Da Trehalose die wichtigste Speicher- und Transportform von Glucose in vielen Insekten, Pilzen und einigen pflanzlichen Pollenkörpern ist, sind Trehalaseinhibitoren im Pflanzenschutz gesucht. Bekannt geworden sind bisher außer den Validamycinen die Trehalaseinhibitoren Trehalostatin^[10], Trehazolin^[10] und Suidatrestin^[11]. Salbostatin **2** könnte als weitere Leitstruktur zur Herstellung neuer Wirkstoffe dienen.

Die Rolle von Salbostatin für den Organismus *Streptomyces albus*, ATCC 21838, wird in Zusammenhang mit der reichlichen Trehalosebildung gesehen. Über die Bedeutung des Trehalosemetabolismus für die Sporulation bei *Streptomyces griseus* und für die Hydrobiose und Anhydrobiose in Hefen ist berichtet worden^[12].

Die Säurefraktion aus *Streptomyces albus* haben wir noch nicht weiter untersucht. Als amphotere Substanzen wurden jedoch Fructos-1-yl-dipeptide mit starker Hemmwirkung auf die Endopeptidase EC 3.4.24.11 isoliert, die allerdings nur in extrem geringer Konzentration auftreten^[13]. Salbostatin **2** ist somit nach dem Salinomycin der mengenmäßig bedeutsamste Metabolit von *Streptomyces albus*, ATCC 21838.

Experimentelles

Verwendete Geräte: HR-EI-Massenspektrometer Kratos MS-902S (70 eV, R.P. 10000); CI-Massenspektrometer Kratos MS-80RFA (Isobutan); ^1H -NMR-Spektrometer Bruker AX-270 und AM-400WB.

Isolierung von **1** und **2**: 1800 L Kulturfiltrat einer 12-Tage-Fermentationslösung von einer Salinomycin überproduzierenden Mutante des *Streptomyces albus*, ATCC 21838, wurden mit 600 L *n*-Butanol extrahiert, und aus diesem Extrakt durch Chromatographie an Kieselgel die unpolaren Stoffe isoliert. Die wäßrige Phase wurde im Vakuum auf 150 L eingengt und mit 600 L CH_3OH verdünnt. Nach Abtrennen des hochmolekularen Niederschlags wurden die basischen Inhaltsstoffe am Kationenaustauscher Dowex 50 WX2 (Säureform) adsorbiert und anschließend mit 0.5 M wäßrigem NH_3 desorbiert. Das erhaltene Produktgemisch wurde durch Chromatographie an S-Sepharose und an Fractogel TSK HW-40 aufgetrennt (Kontrolle durch Iod-, Rydon-Smith-, α -Naphthol/Schwefelsäure-Anfärbung und durch UV-Detektion bei 210 nm). Man erhielt insgesamt 0.9 g **1** und 1.5 g **2**.

Hexaacetylderivat von **1**: 10 mg **1** wurden in 3 mL wasserfreiem Pyridin und 1 mL Acetanhydrid gelöst und 15 h bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde mit Eis versetzt und mit CHCl_3 extrahiert. Nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1) wurden 5 mg Hexaacetyl-**1** isoliert. HR-EI-MS: m/z : 506.1865 (0.2%) [$M^+ + \text{H}^+$], ber. 506.1874 für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{NO}_{13}$, 446.1437 (3%) [$M - \text{AcNH}_2$, ber. 446.1425], 330.1193 (4%) [$M - \text{OCH}_2\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2\text{OAc}$, ber. 330.1188], 159.0662 (100%) [$^+ \text{CH}_2\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}_2\text{OAc}$, ber. 159.0657], 143.0584 (40%) [$\text{AcOCH}=\text{CHNHAc}^+$, ber. 143.0582]; ^1H -NMR (CDCl_3 , 270 MHz): δ = 5.15, 5.10 (2 t, 9 Hz, 3 α -H, 4 β -H), 5.0 (d, 3.5 Hz, 1 α -H), 4.1–4.4 (m, 7H), 3.65 (m, OCH_2), 2.0–2.1 (6 OAc).

Salbostatin **2**: $[\alpha]_D^{20} = +115$ ($c = 1$, H_2O); $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_9$ (321); CI-MS: m/z : 322 (100%) [$M^+ + \text{H}^+$], 304 (11%) [$M^+ - \text{H}_2\text{O}$], 286 (9%) [$M^+ - 2 \text{H}_2\text{O}$], 164 (33%) [$^+ \text{H}_3\text{NC}_6\text{H}_{11}\text{O}_4$]; ^1H -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$, 400 MHz; siehe Tabelle 1); ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 68 MHz): δ = 52.8 (d, C-1'), 57.6 (d, C-2), 61.4 (t, C-6, C-7), 69.1 (t, C-1), 70.2, 70.5, 70.9, 72.9, 76.6, 81.7 (je d, C-3, C-4, C-5, C-6', C-7', 120.4 (d, C-2'), 140.5 (s, C-3').

Heptaacetylderivat von **2**: 50 mg Salbostatin **2** wurden in 6 mL wasserfreiem Pyridin und 2 mL Acetanhydrid gelöst, 15 h bei Raumtemperatur belassen, anschließend mit Eis versetzt und mit CHCl_3 extrahiert. Chromatographische Reinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 99:1) ergab 16.6 mg Heptaacetylsalbostatin **2'**. HR-EI-MS: m/z : 615.2108 (4%) [M^+], ber. 615.2164 für $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_{15}$, 555.1911 (25%) [$M - \text{AcOH}$, ber. 555.1952], 495.1698 (17%) [$M - 2 \text{AcOH}$, ber. 495.1741], 471.1743 (22%) [$M - \text{AcOCH}=\text{CHOAc}$, ber. 471.1740], 231.0865 (100%) [$\text{AcOCH}_2\text{CH}(\text{OAc})\text{CH}(\text{OAc})^+$, ber. 231.0868]; ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) siehe Tabelle 1, NOE-Differenzspektroskopie und Abbildung 1.

Eingegangen am 22. April 1994 [Z 6869]

- [1] S. Umezawa, K. Tsuchiya, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 20–27; H. Zährner, H. Drautz, W. Weber in *Bioactive Microbial Products; Search and Discovery* (Hrsg.: J. D. Bu'Lock, L. J. Nisbet, D. J. Winstanley), Academic Press, New York, **1982**, S. 51–70; S. Breiding-Mack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 952–960.
- [2] Y. Miyazaki, M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, C. Hirose, J. Nagatsu, S. Esumi, *J. Antibiot.* **1974**, *27*, 814–821; J. W. Westley, J. F. Blount, R. H. Evans, C.-M. Liu, *ibid.* **1977**, *30*, 610–612.
- [3] E. F. Paulus, L. Vértessy, G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1984**, *40*, 700–703.
- [4] a) J. A. F. Op den Kamp, P. P. M. Bensen, L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *176*, 298–305; E. Altmann, J. R. Brisson, M. B. Perry, *Carbohydr. Res.* **1988**, *183*, 321–331; b) N. C. Phillips, L. Chedid, J. M. Bernard, M. Level, P. Lefrancier, *J. Biol. Response Modif.* **1987**, *6*, 678–691.
- [5] L. Vértessy, H.-W. Fehlhaber, A. Schulz (Hoechst AG), DE-A 3 836 675 A1, **1988**; [Chem. Abstr. **1989**, *113*, 96134 x].
- [6] a) H. Paulsen, F. R. Heiker, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 930–931; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 904–905; b) H. G. Fletcher, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 706–707.
- [7] Y. Shiga, H. Mizuno, H. Akanuma, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7138–41.
- [8] a) Y. Kamada, S. Horii, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 746–747; b) E. Truscheit, W. Frommer, B. Junge, D. D. Schmidt, W. Wingender, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 738–755; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 744–761.
- [9] Dr. F. E. Beyhl (Hoechst AG), unveröffentlicht.
- [10] S. Ogawa, C. Uchida, Y. Yuming, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 886–888.
- [11] S. Murao, EP-A 0 566 275 A1, **1992**.
- [12] M. J. McBride, J. C. Ensign, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 3637–3643; C. Marino, M. Curto, R. Bruno, M. T. Rinaldo, *Int. J. Biochem.* **1989**, *21*, 1369–1375.
- [13] L. Vértessy, P. Schindler, H. Kogler, H. W. Fehlhaber (Hoechst AG), EP-A 0 288 897, **1988**; [Chem. Abstr. **1989**, *110*, P 193414j].