

1. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

177. Mitteilung¹⁾

Avilamycin C

von William Heilman, Ernst Kupfer und Walter Keller-Schierlein,

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, CH-8092 Zürich

Hans Zähner und Heinz Wolf

Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität, D-74 Tübingen

und Heinrich H. Peter

Pharma-Forschungslaboratorien der Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel

(14.XI.78)

Summary

From cultures of the Avilamycin (Avilamycin A) producing organism, *Streptomyces viridochromogenes*, strain ETH 23575, a second antibiotic, Avilamycin C, $C_{61}H_{90}Cl_2O_{32}$ could be isolated in crystalline form. Both Avilamycins belong to the group of the Orthosomycins. By IR., 1H - and ^{13}C -NMR. spectroscopy and by transformation to a common derivative it could be proven that Avilamycin A is a methyl ketone, Avilamycin C the corresponding methyl carbinol.

Vor ca. 10 Jahren wurde über die Isolierung und Charakterisierung des Avilamycins, eines antibakteriellen Antibioticums aus *Streptomyces viridochromogenes*, Stamm ETH 23575, berichtet [2]. Es gehört zusammen mit den Evernino-micinen [3], dem Curamycin [4] und dem Flambamycin [5] zur Gruppe der Orthosomycine²⁾. Noch wenig charakterisierte Vertreter derselben Gruppe sind wahrscheinlich das Exfoliatin [6] und die Sporacuracine [7].

Bei der Herstellung grösserer Mengen von Avilamycin fielen Extrakte an, die gemäss Dünnschichtchromatographie neben Avilamycin, das wir in Zukunft Avilamycin A nennen, grössere Mengen eines zweiten Antibioticums mit kleinerem Rf-Wert enthielten, das Avilamycin C. Daneben liess sich durch Dünnschicht-chromatographie eine geringe Menge Avilamycin B erkennen, das vorläufig nicht näher untersucht wurde. Spurenkomponenten mit kleinerem Rf-Wert als Avila-

¹⁾ 176. Mitt. s. [1].

²⁾ Der Name *Orthosomycine* als Gruppenbezeichnung wurde von W.D. Ollis in einem Brief vom 23. September 1976 vorgeschlagen und wird von uns übernommen.

mycin C, die meisten mit geringer oder gar keiner biologischen Wirksamkeit, konnten z. T. als Abbauprodukte der Avilamycine erkannt werden.

Avilamycin C bildet sich vor allem bei längerer Fermentationsdauer (48 Std. und länger), während nach 24stdg. Züchtung ausschliesslich oder vorwiegend Avilamycin A erhalten wurde. Die präparative Trennung gelang leicht durch Chromatographie an Kieselgel und gab die Avilamycine A und C in kristalliner, chromatographisch einheitlicher Form.

Das Avilamycin A besass die gleichen Eigenschaften wie das früher isolierte Präparat [2]. Die Mikroanalysen des Avilamycins C unterscheiden sich kaum von denen der Komponente A und sind u. a. mit einer Bruttoformel $C_{61}H_{90}Cl_2O_{32} \cdot 2 H_2O$ vereinbar, der auch das ^{13}C -NMR.-Spektrum mit ca. 61 Signalen entspricht³⁾.

Das UV.-Spektrum in Methanol mit Maxima bei 218 nm ($\log \varepsilon$ 4,12) und 284 nm (breit, $\log \varepsilon$ 3,33) sowie einer Schulter bei ca. 300 nm ist gleich wie das von Avilamycin A im gleichen Lösungsmittel und weist auf einen Dichlorisoeverinsäure-Rest hin, der als Chromophor des Avilamycins A nachgewiesen wurde [2]. Charakteristische Unterschiede sind dagegen im IR.-, 1H -NMR.- und ^{13}C -NMR.-Spektrum zu erkennen. Im Carbonyl-Gebiet des IR.-Spektrums (Fig. 1) besitzt Avilamycin A zwei Maxima bei 1740 und 1715 cm^{-1} (Ester- und Keto-Gruppe), Avilamycin C zeigt dagegen nur die Bande bei 1740 cm^{-1} (Fig. 2). Dementsprechend finden wir im ^{13}C -NMR.-Spektrum von Avilamycin A ein Keton-Signal bei 206,17 ppm, das beim Avilamycin C fehlt. Im 1H -NMR.-Spektrum von Avilamycin A (Fig. 3)

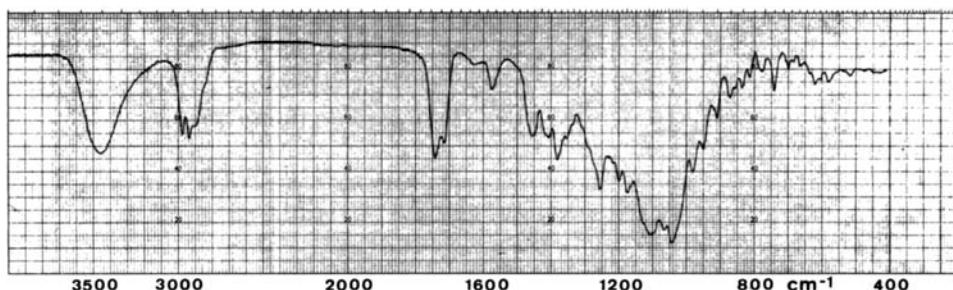


Fig. 1. IR.-Spektrum von Avilamycin A in KBr

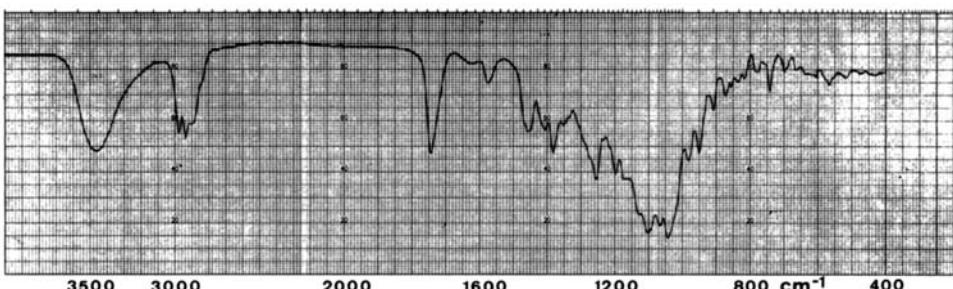
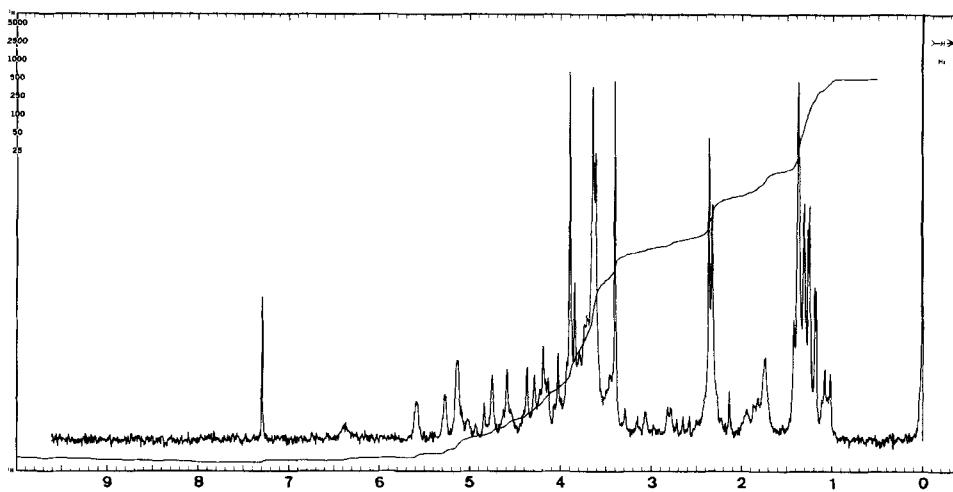
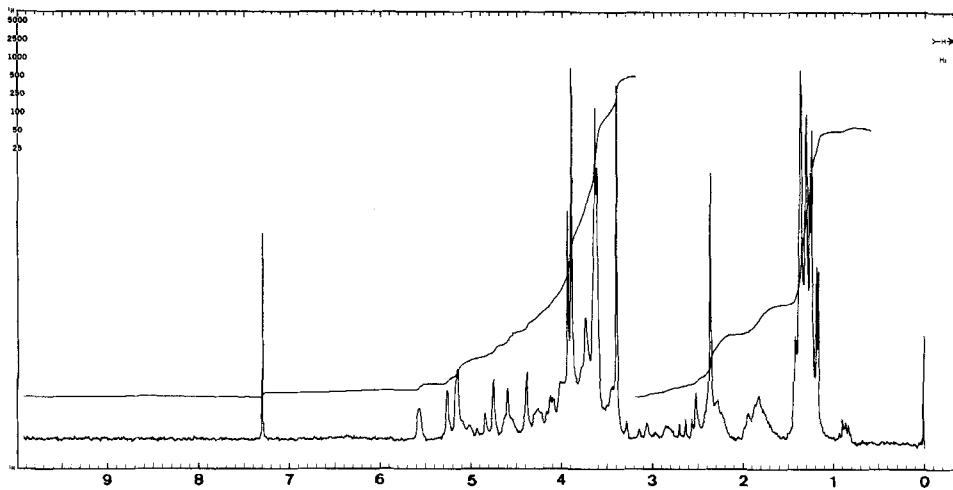


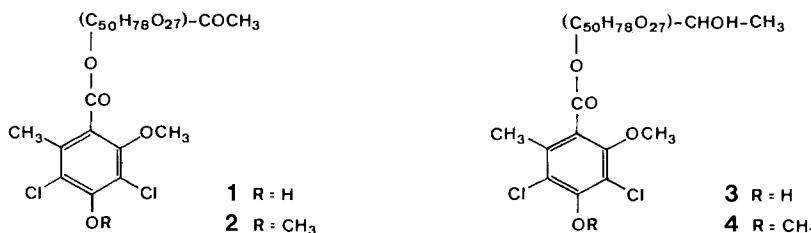
Fig. 2. IR.-Spektrum von Avilamycin C in KBr

³⁾ Einzelheiten der Spektren werden wir im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung in einer nachfolgenden Abhandlung diskutieren.

Fig. 3. ^1H -NMR-Spektrum von Avilamycin A in CDCl_3 (100 MHz)Fig. 4. ^1H -NMR-Spektrum von Avilamycin C in CDCl_3 (100 MHz)

erkennen wir in der 2 ppm-Gegend zwei Methylsingulette (2,31 und 2,35 ppm), in demjenigen von Avilamycin C (Fig. 4) dagegen nur eines (2,35 ppm). Das Signal bei 2,35 ppm muss der Methylgruppe im Dichlorisoeverninsäure-Rest zugeschrieben werden. Beim Avilamycin A kommt dazu eine Methylketon-Gruppierung, wie sie z. B. im Eurekansäureteil des Flambamycins vorkommt [8]. Da die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der beiden Avilamycine im übrigen nur geringfügige Abweichungen aufweisen, vermuteten wir, dass sich die beiden Antibiotica wie Methylketon und Methylcarbinol zueinander verhalten.

Diese Hypothese wurde bestätigt durch eine chemische Verknüpfung der beiden Verbindungen. Das Produktgemisch der Reduktion von Avilamycin A (1) mit Natriumborhydrid bestand aus mehreren Komponenten, von denen eine besonders



starke im Dünnschichtchromatogramm mit Avilamycin C (3) übereinstimmte. Viel einheitlicher verlief die Reduktion mit Avilamycin A-monomethyläther (2), der mit Diazomethan hergestellt wurde. Das Reduktionsprodukt wurde kristallin erhalten und stimmte in allen Eigenschaften mit Avilamycin C-monomethyläther (4) überein, der aus Avilamycin C mit Diazomethan bereitet wurde.

Bei der Reduktion wird ein neues Chiralitätszentrum gebildet, so dass zwei diastereomere Reduktionsprodukte erwartet werden. Tatsächlich entstand aber in stark überwiegender Menge ein einheitliches Hauptprodukt, das mit dem Methyläther von natürlichem Avilamycin C übereinstimmt. Ob eine geringe Nebenkomponente, die chromatographisch abgetrennt wurde, der diastereomere Alkohol ist, konnte nicht abgeklärt werden, da seine Menge für eine einwandfreie Charakterisierung nicht ausreichte.

Somit gelten die früher mit Avilamycin A erhaltenen Abbau-Ergebnisse auch für Avilamycin C, und umgekehrt können Ergebnisse über die Strukturaufklärung von Avilamycin C, über die wir in einer späteren Abhandlung berichten werden, *mutatis mutandis* auf das Avilamycin A übertragen werden.

Avilamycin C hemmt in geringer Konzentration das Wachstum zahlreicher gram-positiver Bakterien. Vergleichende Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentration im Verdünnungsreihentest mit Avilamycin A und C ergaben eine grössere Empfindlichkeit der Bakterien gegen Avilamycin A (Tab.). Um eine bakterizide Wirkung zu erreichen, wurde etwa das Zehnfache der minimalen Hemmkonzentrationen benötigt.

Tabelle. Minimale Hemmkonzentration von Avilamycin A und C bei Bakterien im Verdünnungsreihentest

Stamm	Minimale Hemmkonzentration ^{a)} (µg/ml)	
	Avilamycin A	Avilamycin C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 11095	> 10	> 10
<i>Arthrobacter globiformis</i> ATCC 8010	0,01-0,1	0,1-1
<i>Bacillus brevis</i> ATCC 9999	0,01-0,1	0,1-1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	0,1-1	1-10
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 14067	> 10	> 10
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9172	> 10	> 10
<i>Corynebacterium poinsettiae</i> ATCC 9682	0,01-0,1	0,1-1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 12435	> 10	> 10
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	> 10	> 10
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 381	0,01-0,1	0,1-1
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü ^{b)} 57	> 10	> 10

^{a)} Komplexmedium - Einstaatsdichte: 2×10^6 Zellen/ml.

^{b)} Stammsammlung des *Instituts für Mikrobiologie I*, Universität Tübingen.

Einbauversuche mit wachsenden Zellen von *Bacillus brevis* ATCC 9999 zeigten, dass Avilamycin C die Proteinbiosynthese unmittelbar nach Zugabe blockiert, während die Bildung von DNS und RNS zunächst nicht gestört wird. Durch das Antibiotikum wurde die Polyphenylalaninsynthese in einem zellfreien System aus *Escherichia coli* A19 zu 65% gehemmt. Untersuchungen zur Wirkungsweise von Avilamycin A führten zu ähnlichen Ergebnissen [2].

Experimenteller Teil

Isolierung der reinen Avilamycine A und C. Das Rohavilamycin aus einer ca. 50 Std. alten Kultur von *Streptomyces viridochromogenes* gab bei der Dünnschichtchromatographie (Merck Fertigplatten F254) mit Chloroform/Methanol 9:1, und Sprühen mit Schwefelsäure zwei Hauptflecke mit Rf 0,375 (Avilamycin A) und 0,208 (Avilamycin C) sowie mehrere wesentlich schwächere Flecke mit Rf 0,266 (Avilamycin A), 0,142, 0,050, 0,042 und 0,033. 6 g Rohmaterial wurden an 600 g Kieselgel 60 (Merck) chromatographiert mit Chloroform/Methanol 9:1 als Eluierungsmittel. Es wurden 1,2 g Avilamycin A, 0,3 g noch uneinheitliches Avilamycin B und 2,4 g Avilamycin C erhalten. Alle späteren Fraktionen waren uneinheitlich und zeigten nur geringe biologische Wirksamkeit. Die beiden Hauptfraktionen wurden je nochmals chromatographiert und gaben dann dünnschicht-chromatographisch einheitliche Produkte, 1,15 g Avilamycin A und 2,20 g Avilamycin C.

Avilamycin A (1). Nach Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther farblose Nadeln, Smp. 181–182°. – UV. (Methanol) (λ_{max} in nm) ($\log \epsilon$): 227 (4,15), 286 br. (3,33), ca. 300 Sch. (3,1). – Rf-Wert und IR.-Spektrum entsprachen denen des früher beschriebenen Präparates [2]. – IR in KBr: *Figur 1.* – $^1\text{H-NMR}$. in CDCl_3 : *Figur 3.*

$\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{Cl}_2\text{O}_{32} \cdot \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 51,51	H 6,38	Cl 4,99%
$\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{Cl}_2\text{O}_{32} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Ber. „ 50,86	„ 6,44	„ 4,92%
(1440,26)	Gef. „ 51,17	„ 6,26	„ 4,85%

Avilamycin C (3). Farblose feine Plättchen, Smp. 188–189° (Aceton/Äther). $[a]_D = -4,8^\circ$ ($c = 1,44$, Chlf.). – UV (Methanol): 228 (4,12), 284 br. (3,33), ca. 300 Sch. (3,12). – IR. in KBr: *Figur 2.* – $^1\text{H-NMR}$. (CDCl_3): *Figur 4.*

$\text{C}_{61}\text{H}_{90}\text{Cl}_2\text{O}_{32} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1442,27) Ber. C 50,79 H 6,57 Cl 4,92% Gef. C 50,83 H 6,35 Cl 4,85%

Mol.-Gew. (Dampfdruckosmometrie in CH_2Cl_2) Gef. 1266,7.

Avilamycin A-methyläther (2). Zu 200 mg Avilamycin A in 5 ml Benzol/Methanol 1:1 wurde unter Eiskühlung Diazomethan in Äther bis zur bleibenden Gelbfärbung gegeben. Nach dem Einengen i.V. wurde an 25 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol 40:1 chromatographiert. Die das Hauptprodukt enthaltenden Fraktionen wurden weiter auf einer Dickschichtplatte (Kieselgel 60, Schichtdicke 1 mm) gereinigt, wobei nur der mittlere Teil der Hauptzone eluiert, und das Eluat aus Aceton/Benzol umkristallisiert wurde: 70 mg farblose Kristalle mit Smp. 204–204,5°. – $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz, CDCl_3): u.a. 5 s zu 3 H bei 3,40, 3,62, 3,65, 3,90 und 3,93 ppm; sonst fast völlige Übereinstimmung mit Avilamycin A, das nur 4 OCH_3 -Signale zeigt.

$\text{C}_{62}\text{H}_{90}\text{Cl}_2\text{O}_{32} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1454,28) Ber. C 51,20 H 6,52 Cl 4,88% Gef. C 51,17 H 6,30 Cl 5,33%

Avilamycin C-methyläther (4). a) *Aus Avilamycin C.* Die Herstellung des Methyläthers aus 300 mg Avilamycin C und die Reinigung erfolgten in gleicher Weise wie beim Avilamycin A. Nach Umkristallisieren aus Aceton/Benzol Smp. 214°. $[a]_D^{25} = -4,4^\circ$ ($c = 1,11$, Chlf.).

b) *Aus Avilamycin A-methyläther.* 300 mg Avilamycin A wurden wie oben mit Diazomethan veräthert und an einer Kieselgelsäule gereinigt. Ausbeute 301 mg nahezu reiner Methyläther. Das Produkt wurde in Benzol/Methanol gelöst und unter Eiskühlung mit 59 mg Natriumborhydrid in Methanol reduziert. Nach 30 Min. wurde mit Wasser zersetzt, Benzol und Methanol i.V. abgetrieben und der wässrige Rückstand 3mal mit Methylenechlorid ausgeschüttelt. Das Rohprodukt enthielt

gemäss Dünnschichtchromatographie (Äthylacetat als Fliessmittel) ein Hauptprodukt mit R_f 0,23 und eine geringe Nebenkomponente mit R_f 0,11. Die Reinigung erfolgte zunächst an einer Kieselgelsäule, dann durch präp. Schichtchromatographie, wobei wieder nur der zentrale Teil der Hauptzone eluiert wurde. Nach dem Umkristallisieren Smp. 212,5–213°, keine Erniedrigung im Gemisch mit dem obigen Präparat. $[\alpha]_D = -4,3^\circ$ ($c = 1,16$, Chlf.).

Bei der Dünnschichtchromatographie zeigten beide Präparate gleiches Verhalten: R_f 0,66, (Chloroform/Methanol 9:1), R_f 0,22 (Äthylacetat). Sie stimmten ferner in den IR.-Spektren in KBr und in Chloroform, im ^1H -NMR.- und ^{13}C -NMR.-Spektrum völlig überein.

Die Analysen wurden im analytischen Laboratorium der ETHZ (Leitung Herr *W. Manser*) ausgeführt. Die IR.- und NMR.-Spektren verdanken wir der spektroskopischen Abteilung der ETHZ (Leitung Herr Prof. Dr. *J. F. M. Oth*).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. Diddens, M. Dorgerloh & H. Zähner*, J. Antibiotics (in Druck).
- [2] *F. Buzzetti, F. Eisenberg, H.N. Grant, W. Keller-Schierlein, W. Voser & H. Zähner*, Experientia 24, 320 (1968); *H. Wolf*, FEBS Letters 36, 181 (1973).
- [3] *A.K. Ganguly & A.K. Saksena*, J. Antibiotics (Tokyo) 28, 707 (1975); *A.K. Ganguly & S. Szmulewicz*, J. Antibiotics (Tokyo) 28, 711 (1975); *A.K. Ganguly, O.Z. Sarre, D. Greeves & J. Morton*, J. Amer. chem. Soc. 97, 1982 (1975); *A.K. Ganguly, S. Szmulewicz, O.Z. Sarre & V.M. Girijavallabhan*, J. chem. Soc. Chem. Commun. 1976, 609; *A.K. Ganguly, O.Z. Sarre, A.T. McPhail & K.D. Onan*, J. chem. Soc., Chem. Commun. 1977, 313.
- [4] *O.L. Galmarini & V. Deulofeu*, Tetrahedron 15, 76 (1961); *E.G. Gros, V. Deulofeu, O.L. Galmarini & B. Frydman*, Experientia 24, 323 (1968).
- [5] *L. Ninet, F. Benazet, Y. Charpentier, M. Dubost, J. Florent, J. Lunel, D. Mancy & J. Preud'homme*, Experientia 30, 1270 (1974); *W.D. Ollis, Ch. Smith, I.O. Sutherland & D.E. Wright*, J. chem. Soc. Chem. Commun. 1976, 350; *W.D. Ollis, I.O. Sutherland, B.F. Taylor, Ch. Smith & D.E. Wright*, Tetrahedron (im Druck).
- [6] *H. Umezawa, S. Takahashi, T. Takeuchi, K. Maeda & Y. Okami*, J. Antibiotics (Tokyo) 5, 466 (1952).
- [7] *A. Tamura et al.*, Japan Pat. 75-125094 (1975), J. Antibiotics (Tokyo) 30, Anhang 77–111 (1977).
- [8] *W.D. Ollis, Ch. Smith & D.E. Wright*, J. chem. Soc. Chem. Commun. 1976, 348.