

Mikrobiologische Umwandlungen nichtsteroider Strukturen, III *)

Hydroxylierung von 5-Alkyl-2-(benzolsulfonylamino)pyrimidinen und strukturverwandten Antidiabetika

Gerhard Siewert, Klaus Kieslich **, Georg-Alexander Hoyer und Douwe Rosenberg

Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen

Eingegangen am 8. Dezember 1972

5-Alkyl-2-(arylsulfonylamino)pyrimidine (**1**–**5** und **11**–**16**) wurden mikrobiologisch hydroxyliert. Mit *Streptomyces griseolus* wurden Propyl-, Butyl- und Isobutylgruppen an C-2, Äthylgruppen an C-1, Isopropylgruppen an C-1 und C-2, sowie Neopentylgruppen an C-3 hydroxyliert. Die Antidiabetika Glibenclamid (**25**) und Glisoxepid (**29**) mit Sulfonylharnstoff-Struktur wurden zu Sulfonamiden abgebaut, ferner wurden in 2- und 4-Stellung des Cyclohexanrings von **25** Hydroxylgruppen eingeführt.

Microbiological Transformations of Nonsteroidal Structures, III *)

Hydroxylation of 5-Alkyl-2-(benzenesulfonylamino)pyrimidines and Structurally Related Antidiabetics

5-Alkyl-2-(arylsulfonylamino)pyrimidines (**1**–**5** and **11**–**16**) have been hydroxylated microbologically. Propyl, butyl, and isobutyl groups were hydroxylated at C-2, ethyl groups at C-1, isopropyl groups at C-1 and C-2, and neopentyl groups at C-3, respectively, by *Streptomyces griseolus*. The sulfonylurea part of the antidiabetics glibenclamid (**25**) and glisoxepid (**29**) was degraded to sulfonamide; in addition, hydroxyl groups were introduced into the 2- and 4-positions of the cyclohexane ring of **25**.

In den vergangenen Jahren gewannen 5-alkylsubstituierte (Benzolsulfonylamino)pyrimidine als antidiabetisch wirksame Substanzen Bedeutung^{1,2)}. Gekoppelt mit der Wirksamkeit und Toxizität derartiger oraler Pharmaka besitzt der Abbauweg der Verbindungen im Tierkörper eine wesentliche Bedeutung. Das eingehender untersuchte 4-(5-Isobutyl-2-pyrimidinylsulfamoyl)phenylelessigsäure-(5-chlor-2-methoxyanilid) (**1**) wird über eine Hydroxylierung des tertiären C-Atoms des Isobutylrestes in der Leber metabolisiert³⁾. Da die chemische Synthese dieses ersten Metaboliten (**6**)

*) I. und II. Mitteil.: *H. Kosmol, K. Kieslich und H. Gibian*, Liebigs Ann. Chem. **711**, 38 bzw. 42 (1968).

**) Anschrift: Schering AG, Werk Charlottenburg, Mikrobiologische Chemie, D-1000 Berlin 10, Tegeler Weg 28–33.

1) 1a) *Schering AG* (Erf. *K. Gutsche* und *E. Schröder*), D.O.S. 1695855 vom 13. 5. 1971. — 1b) *K. Gutsche, O. Loge* und *E. Schröder*, *Arzneim.-Forsch.*, in Vorbereitung.

2) 2a) *Schering AG* (Erf. *C. Rufer, H. Ahrens, H. Biere, E. Schröder, E. Gerhards, E. Schillinger, W. F. Losert* und *O. Loge*), D.O.S. 2021962 vom 18. 11. 1971. — 2b) *C. Rufer, H. Biere, H. Ahrens, O. Loge* und *E. Schröder*, *J. Med. Chem.*, in Vorbereitung.

3) *E. Gerhards* und *O. Loge*, bisher unpubliziert.

größere Schwierigkeiten ergab, wurde die Herstellung der Substanz durch mikrobiologische Umwandlung von **1** angestrebt. Enzymatische Einführungen von Hydroxylgruppen in Alkylsubstituenten von Heterocyclen waren grundsätzlich bekannt⁴⁾, aber bei vorliegenden 2-Pyrimidinylsulfamoyl-Systemen noch nicht beschrieben.

Obwohl bei derartigen Strukturen wegen vielfältiger Angriffszentren ein rascher Abbau zu befürchten war, zeigten Vorversuche mit einigen *Streptomyces*-Stämmen eine gezielte Reaktion des Alkylsubstituenten unter Bildung des gewünschten Hydroxyproduktes **6**. Zur Auswahl besonders geeigneter Stämme wurden insgesamt 68 Actinomyceten, Streptomyceten und niedere Pilze geprüft. In Schüttelkolbenfermentationen im analytischen Maßstab zeigten folgende Stämme die Fähigkeit zur gewünschten Hydroxylierung (s. Tab. 1):

Tab. 1. Mikrobiologische Umwandlung von 4-(5-Isobutyl-2-pyrimidinylsulfamoyl)phenylessigsäure-(5-chlor-2-methoxyanilid) (**1**)

Mikroorganismus	Herkunft	Schering-Sammlung Nr.	Hauptumwandlungsprodukt, nach R_F identisch mit 1. Metaboliten 6	weitere Umwandlungsprodukte
<i>Streptomyces erythreus</i>	ATCC 11635	305	+	+
<i>Streptomyces griseolus</i>	ATCC 11796	307	+	—
<i>Streptomyces griseus</i>	ATCC 10137	308	+	—
<i>Streptomyces lavendulae</i>	ATCC 8664	309	+	+
<i>Streptomyces noursei</i>	ATCC 11455	310	+	+
<i>Streptomyces rimosus</i>	ATCC 10970	311	+	+
<i>Streptomyces roseochromogenus</i>	ATCC 3347	312	+	+
<i>Streptomyces roseochromogenus</i>	ATCC 13400	313	+	+
<i>Streptomyces spec.</i>	ATCC 11862	316	—	(+)
<i>Streptomyces surinam</i>		317	+	—

Die besondere Eignung von Streptomyceten überrascht. Als gemeinsames Merkmal der Stämme ist jedoch nur die Biosynthesefähigkeit unterschiedlicher Antibiotika zu sehen. Einige der Streptomyceten bilden zusätzliche Umwandlungsprodukte.

Nach diesem Ergebnis konnte in 2-*l*-Schüttelkolbenfermentationen mit *Streptomyces roseochromogenus* (ATCC 13400) das 4-[5-(2-Hydroxy-2-methylpropyl)-2-pyrimidinylsulfamoyl]phenylessigsäure-(5-chlor-2-methoxyanilid) (**6**) präparativ hergestellt werden. Bei der chromatographischen Reinigung ließ sich aus den polaren Fraktionen ein zweiter Metabolit isolieren, dem die dihydroxylierte Struktur 4-[5-(1,2-Dihydroxy-2-methylpropyl)-2-pyrimidinylsulfamoyl]phenylessigsäure-(5-chlor-2-methoxyanilid) [**6**, CH(OH)C(CH₃)₂OH statt CH₂C(CH₃)₂OH] zukommt. Die besten Ausbeuten der gewünschten Monohydroxyverbindung **6** lieferte der Stamm *Streptomyces erythreus* (ATCC 11635) in einer 30-*l*-Fermentationsanlage, wobei in 48 h Inkubationszeit bei einer Substratkonzentration von 200 mg/l Kulturbrühe bis zu 67% Reinprodukt erhalten wurden⁵⁾.

⁴⁾ G. S. Fonken und R. A. Johnson, Chemical Oxidations with Microorganisms, Marcel Dekker Inc., New York 1972.

⁵⁾ Schering AG (Erf. G. Siewert und K. Kieslich), Deutsche Patentanmeldung Nr. 2.202410, angemeldet am 14. 1. 1972.

Zur Strukturaufklärung dieser beiden und aller weiteren Hydroxylierungsprodukte eignen sich ganz besonders die NMR-Spektren, da alle Signale gut voneinander getrennt sind und somit leicht analysiert werden können (Tab. 6). Weiterhin lassen sich die verschiedenen funktionellen Gruppen der Umwandlungsprodukte im IR eindeutig charakterisieren (Tab. 6).

Bei **6** ist gegenüber dem Ausgangsprodukt **1** nur die Isobutylgruppe verändert worden. Das Erscheinen von zwei Singulets bei δ 2.64 und 1.16 ppm für 2 bzw. 6 Protonen läßt nur die Hydroxylierung am tert. C-Atom zu. Die Hydroxygruppe ist im IR-Spektrum bei 3450 cm^{-1} zu erkennen. Bei der Dihydroxy-Verbindung [**6**, $\text{CH}(\text{OH})\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ statt $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$] dagegen ist das Singulett der benzylichen Methylengruppe verschwunden, und es erscheint ein neues 1-Protonensingulett bei δ 4.44 ppm. Das deutet auf eine zusätzliche Hydroxylierung in α -Stellung der ursprünglichen Isobutylgruppe hin und erklärt zugleich, daß die beiden chemisch äquivalenten Methylgruppen als zwei dicht beieinander liegende Singulets vorkommen, da in ihrer Nachbarschaft jetzt ein chirales Zentrum vorhanden ist.

Mit dem Ziel möglicher Wirkungsveränderung wurden nach diesem überraschend guten Ergebnis weitere Substanzen untersucht, die sich entweder nur durch Veränderung im 5-Chlor-2-methoxyanilin-Teil des Moleküls unterscheiden oder bei sonst gleicher Struktur eine veränderte Pyrimidinseitenkette besitzen. Die Verbindungen der 1. Gruppe sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Sie ergaben mit *Streptomyces griseolus* (ATCC 11796) ausnahmslos Hauptumwandlungsprodukte mit ähnlichen R_g -Werten wie der Metabolit **6** und sind daher sehr wahrscheinlich ebenfalls durch Hydroxylierung des tertiären C-Atoms der Isobutylseitenkette entstanden. Als Beweis wurden die Umwandlungsprodukte **7** und **8** der Substrate **2** und **3**, bei welchen der 5-Chlor-substituent des endständigen Phenylringes durch Fluor bzw. Methyl ersetzt ist, isoliert und die erwartete Struktur bestätigt.

Beide Hydroxylierungsprodukte **7** und **8** weisen zwei Singulets bei nahezu dem gleichen magnetischen Feld wie **6** auf und besitzen deshalb auch eine am tert. C-Atom hydroxylierte Isobutylgruppe. Auch bei diesen beiden Verbindungen ist im Rest des Moleküls keine Veränderung eingetreten, wie durch Vergleich mit den NMR-Spektren der Ausgangsprodukte abgeleitet werden konnte.

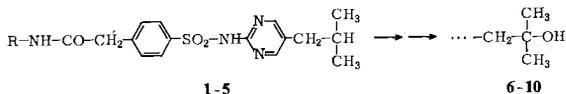
Diese Resultate lassen erkennen, daß eine gewisse Variation des Anilid-Teiles des Substrates möglich ist, ohne die Reaktion selbst oder die enzymatische Angriffsrichtung wesentlich zu beeinflussen.

Tab. 3 enthält die Verbindungen der zweiten Gruppe zusammen mit den daraus isolierten und aufgeklärten Umwandlungsprodukten.

Bei allen Reaktionsprodukten dieser Gruppe erfolgt auch nur wieder der Angriff an der Alkylgruppe mit Ausnahme von **23**, wo im NMR-Spektrum das Fehlen des Signals der aromatischen Methoxygruppe deren mikrobiologische Abspaltung anzeigt.

Bei der Isopropylverbindung **11** wurde einmal die Hydroxylgruppe am tert. C-Atom zu **17** eingeführt, was durch das Erscheinen eines 6-Protonensingulets bei δ 1.40 ppm leicht abgeleitet werden kann. Zum anderen muß bei **18** eine der terminalen

Tab. 2. Mikrobiologische Hydroxylierung von 4-(5-Isobutyl-2-pyrimidinylsulfamoyl)phenyl-essigsäure-aniliden der Formel



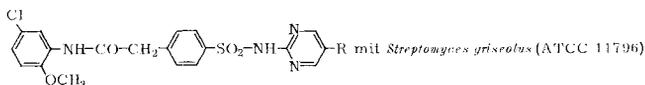
	R	Substrat DC-R ₈ ^{a)}	Umwandlungsprodukt DC-R ₈ ^{a)}
1		1,0	6 0,35
2		1,0	7 0,2
3		1,0	8 0,3
4		0,8	9 0,35
5	 Racemat	0,9	10 0,2
(S)-5	 S-Form	0,9	10 0,2
(R)-5	 R-Form	0,9	10 0,2

^{a)} DC-R₈-Werte im System Chloroform/Aceton/Eisessig (79:20:1), bezogen auf 1.

Methylgruppen hydroxyliert worden sein, denn man erkennt im NMR-Spektrum nach D₂O-Austausch zwei Dubletts, wobei eines der Methylgruppe (δ 1.12 ppm) und das andere der Hydroxymethylgruppe (δ 3.43 ppm) zugeordnet werden kann. Das Methinproton ist im Spektrum offenbar verdeckt. Ein weiterer Hinweis auf diese Konstitution stellt ein diffuses Triplet bei δ 4.66 ppm für ein Proton dar, das bei D₂O-Austausch verschwindet und das Proton der Hydroxymethylgruppe ist.

Die Äthylverbindung **12** wird in α -Stellung hydroxyliert, denn die NMR-Daten sind nur mit einer α -Hydroxyäthylgruppe am aromatischen System vereinbar. Dagegen erfolgt der Angriff bei der n-Propylverbindung **13** und der n-Butylverbindung **14** am β -C-Atom. Das folgt aus den typischen Signallagen und Aufspaltungen der Seiten-

Tab. 3. Umwandlung von Verbindungen der Struktur



Substrat	R	DC-R _S ^{a)}	Umwandlungsprodukt	R	DC-R _S ^{a)}	Ausb. (%)
1		1,0	6		0,35	bis 67
11		0,95	17		0,35	4,8
			18		0,30	4,3
12	-CH ₂ -CH ₃	0,9	19		0,30	4,7
13	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0,95	20		0,25	2,3
14	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0,95	21		0,35	3,7
15		1,05	22		0,4	35
			23^{b)}		0,2	40
16		0,95	24	-OH	0,4	19

a) DC-R_S-Werte im System Chloroform/Aceton/Eisessig (79:20:1), bezogen auf **1**.

b) Die Methoxygruppe vom 5-Chlor-2-methoxyanilin-Rest ist zum freien Phenol gespalten.

kettenprotonen, insbesondere bei **20** das Erscheinen der terminalen Methylgruppe als Dublett (δ 1.02 ppm) und bei **21** das Vorliegen der γ -ständigen Methylengruppe als Quintett mit 4 benachbarten Protonen (δ 1.32 ppm). Aus der Neopentylverbindung **15** erhält man die Produkte **22** und **23**. Bei beiden ist die Seitenkette auf gleiche Weise verändert. Es ist eine der Methylgruppen hydroxyliert worden, wie das 2-Protonensingulett bei δ 3.00 ppm beweist. **23** unterscheidet sich von **22** durch den Ersatz der Methoxy- durch die Hydroxygruppe. Schließlich ist bei der Isopropoxyverbindung **16** die Äthergruppierung gespalten worden, denn im NMR-Spektrum wird die Isopropoxygruppe nicht mehr angezeigt.

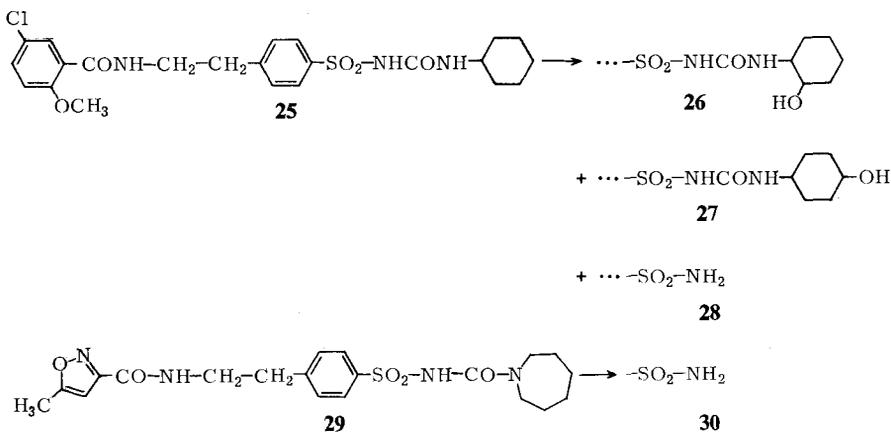
Die unverzweigten Seitenketten der Substrate **12**–**14** mit Äthyl-, n-Propyl- und n-Butylstruktur wurden wesentlich schlechter hydroxyliert als der Isobutylrest der Stammverbindung **1**. Die Reaktivität der Neopentylgruppe von **15** war ebenfalls geringer als die des Isobutylrestes, aber weit besser als die der unverzweigten Substituenten.

Der leichtere Angriff auf einen verzweigten Alkylsubstituenten findet bei den parallel durchgeführten Untersuchungen von *Johnson et al.*⁶⁾ an unterschiedlichen Alkyl-

⁶⁾ R. A. Johnson, H. C. Murray und L. M. Reineke, J. Am. Chem. Soc. **93**, 4872 (1971).

benzamidin nur gewisse Parallelen. Dagegen zeigt sich eine recht gute Übereinstimmung des Angriffszentrums, das nach *Johnson* für die Oxygenase des verwendeten Pilzes *Sporotrichum sulfurescens* einen Abstand von $\sim 5.5 \text{ \AA}$ von der als Enzymfixpunkt fungierenden Amidgruppe aufweist. Die mit *Streptomyces griseolus* hydroxylierten C-Atome sind von der als entsprechende Enzymhaftstelle anzusehenden Sulfonamidgruppe mit ca. $5-6 \text{ \AA}$ ähnlich weit entfernt.

Schließlich wurden zwei strukturverwandte und bereits marktbekannte Antidiabetika auf mikrobiologische Hydroxylierbarkeit untersucht. Glibenclamid⁷⁾ (**25**) und Glisoxepid⁸⁾ (**29**) besitzen eine *N*-{*p*-[2-(Acylamino)äthyl]benzolsulfonyl}-harnstoff-Struktur. Neben dieser Abweichung im Grundgerüst unterscheiden sie sich von den vorher eingesetzten Substraten durch die cyclische Substitution des endständigen Harnstoff-N, der einen Cyclohexylrest (**25**) trägt oder Bestandteil eines Perhydroazepinringes (**29**) ist.



Glibenclamid (**25**) wurde von *Streptomyces griseolus* (ATCC 11796) am Cyclohexylring mit 53% Ausbeute in 2-Stellung zu **26** hydroxyliert. Aus einem größeren Fermentationsansatz konnten zusätzlich als Nebenprodukte das entsprechende 4-Hydroxyderivat **27** und das durch Abbau des Harnstoffteiles entstandene Sulfonamid **28** gewonnen werden. Zwei weitere sehr polare Reaktionsprodukte traten nur in sehr geringer Menge auf und ließen sich nicht in Reinsubstanz isolieren. Sie enthalten jedoch nach spektroskopischen Daten der Rohprodukte noch das intakte Glibenclamid-Gerüst. Die Hydroxylierung in 2-Stellung des Cyclohexylringes bei **26** folgt aus dem typischen Erscheinungsbild der NMR-Signale der Ringprotonen. Das Auftreten eines 4-Protonenmultipletts bei $\delta 0.84-1.30 \text{ ppm}$ zeigt, daß diesen Methylengruppen keine C-N- oder C-O-Gruppen benachbart sein können. Weiterhin deutet das schmale Signal bei $\delta 4.62 \text{ ppm}$ an, daß die neueingeführte Hydroxylgruppe axial steht und das äquatoriale Proton durch benachbarte anisotrope Gruppen stark paramagnetisch

7) H. Weber, W. Aumüller, K. Muth, R. Weyer, R. Heerd, E. Fauland, A. Bender, W. Pfaff, F. H. Schmidt und H. Stork, *Arzneim.-Forsch.* **19**, 1326 (1969).

8) 8a) Bayer AG, D.O.S. 1670952 vom 18. 6. 1970. — 8b) H. Horstmann, H. Plümpe und W. Puls, *Arzneim.-Forsch.*, in Vorbereitung.

Tab. 4. Fermentationsbedingungen^{a)}

Substrat	Ansatz	Methode	Reakt.-Zeit (h)	Umwandlg.- Produkt	Elutions- mittel	Fractionen	umkristallisiert aus	Schmp. (°C)	Ausb. (%)
1	3.2 g	SKK	30—42	6	(A)	(25 ml) 86—135	Methylenchlorid	125—128	2.0 g (60.5)
				b)	(A)	171—245	Methylenchlorid	145—147	34 mg (0.8)
1	6.0 g	Ferm.	34	6	(B)	(100 ml) 30—57	Methanol/H ₂ O Chloroform	174—176 124—127	16.6 g (67)
2	1.0 g	SKK	16	7	—	—	Methylenchlorid	198—199	160 mg (1.5)
3	1.8 g	SKK	15	8	—	—	Methylenchlorid	212—213	130 mg (1.3)
11	1.8 g	SKK	15	17 18	—	—	Aceton Aceton	208—209 183—185	86 mg (4.6) 78 mg (4.2)
12	2.0 g	SKK	38	19	—	—	Methylenchlorid/ Isopropyläther	216—219	94 mg (4.5)
13	2.0 g	SKK	35	20	—	—	Methylenchlorid/ Isopropyläther	169—171	45 mg (2.1)
14	2.0 g	SKK	42	21	—	—	Hexan/Aceton	132—136	74 mg (3.6)
15	2.2 g	SKK	19	22 23	—	—	Hexan/Aceton 1) Hexan/Aceton 2) Methanol/H ₂ O	200—201 228—229	775 mg (34.1) 940 mg (42.4)

16	1.0 g	SKK	34	24	—	—	Aceton	240—242	140 mg (15.3)
16	30 g (5 Ansätze)	Ferm.	21	24	—	—	Aceton	241—242	5.6 g (20.4)
25	1 g	SKK	74	26	(C)	—	Chloroform	188—193	415 mg (40)
Glibenclamid									
25	15 g (3 Ansätze)	Ferm.	40	28	(D)	(15 ml)	Chlorof./Aceton	209—211	890 mg (8.0)
				27	(D)	311—410	Chlorof./Aceton	163—164	37 mg (0.24)
				26	(D)	411—470	Chlorof./Aceton	186—189	8.1 g (53)
				?	(D)	471—620	Chlorof./Aceton		120 mg
						701—750			
29	3 g	Ferm.	34	30	(E)	(14 ml)	Aceton	210—215	450 mg (18.9)
Gliboxepid									

a) Substrat 1 wurde in SKK (= Schüttel-Kolben-Kultur) mit *S. roseochromogenus* (ATCC 13400) und im Fermenter mit *S. erythraeus* (ATCC 11635) umgesetzt. Alle übrigen Substrate wurden mit *S. griseolus* (ATCC 11796) fermentiert.

b) $\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ statt $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$.

verschoben ist. Diese Befunde sind nur in Einklang mit einer 2-Hydroxylierung. Bei **27** ist die Signallage des Protons neben der Hydroxygruppe ($\delta \sim 3.60$ ppm) normal. Außerdem treten zwei Multipletts zu je vier Protonen bei relativ tiefem Feld auf. Bei Annahme einer äquatorialen Hydroxylierung in 4-Stellung des Cyclohexylringes werden diese Lagen verständlich, denn die vier axialen und die vier äquatorialen Protonen der unsubstituierten Methylengruppen sollten in diesem ppm-Bereich jeweils ein Multiplett liefern. Bei **28** fehlt der Cyclohexylrest vollkommen, und das Vorhandensein einer NH_2 -Gruppe im NMR-Spektrum bei $\delta 7.23$ ppm als Singulett legt eine freie Sulfonamidgruppierung nahe. Diese Signallage ist typisch auch für andere Sulfonamide in DMSO, wie wir bei unseren Untersuchungen fanden.

Bei der analogen Fermentation des Glisoxepids (**29**) konnte nur das Abbauprodukt **30** mit Sulfonamidstruktur isoliert werden. Hydroxylierungsprodukte waren sowohl mit *Streptomyces griseolus* (ATCC 11796) als auch bei vergleichsweiser Prüfung anderer Streptomyceten nicht zu beobachten. Die Sulfonamidgruppierung in **30** folgt wieder aus dem 2-Protonensingulett bei $\delta 7.23$ ppm, dessen Zuordnung bei **28** diskutiert worden ist.

Die mikrobiologische Umwandlung der untersuchten Antidiabetika lieferte somit einerseits Metabolite, die bereits durch Organostoffwechseluntersuchungen dieser Pharmaka bekannt^{2,9)} oder als Vergleichssubstanzen chemisch synthetisiert worden waren⁷⁾, führte jedoch auch zu neuen Verbindungen, die Hinweise auf weitere Metabolismen und mögliche aktivitätsverändernde Strukturvariationen ergeben könnten.

Die Substrate wurden uns vom Department Arzneimittelchemie unter Leitung von Dr. E. Schröder zur Verfügung gestellt. Herrn G. Ast danken wir für präparative Mitarbeit und Herrn Dr. G. Cleve für Mithilfe bei der Interpretation der IR-Spektren.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Tottoli bestimmt und sind unkorrigiert. Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-F₂₅₄-Fertigplatten (Fa. Merck AG, Darmstadt) verwendet und mit den Systemen 1) Isopropylalkohol/Ammoniumcarbonatpuffer (72.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in 1 Liter 3 N NH_4OH) (3:1), 2) Essigester/Toluol/Eisessig (68:30:2) oder 3) Chloroform/Aceton/Eisessig (79:20:1) aufsteigend entwickelt. Substrat und Reaktionsprodukte wurden durch UV-Bestrahlung (254 nm) oder durch Anfärben mit Chlor-Tolidin-Reagenz¹⁰⁾ sichtbar gemacht und durch Vergleich mit Standardmengen des Substrates halbquantitativ geschätzt. Für die Säulenchromatographien diente Kieselgel G. Die NMR-Spektren wurden im Varian A 60 und HA 100 und die IR-Spektren mit einem Perkin-Elmer-Modell 621 aufgenommen. Die Mikroanalysen wurden in unserem Kontrollaboratorium unter Leitung von Dipl.-Ing. J. Huber durchgeführt.

a) Vorversuche

100-ml-Erlenmeyer-Kolben wurden mit 20 ml eines 30 min bei 120°C sterilisierten Mediums beschickt, mit 1.5 ml einer Abschwemmung einer Schrägagarkultur des entsprechenden Mikroorganismus mit 4 ml physiologischer NaCl-Lösung beimpft und 3–4 Tage bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (145 U/min) geschüttelt. 1 ml der vermehrten Kultur wurde unter

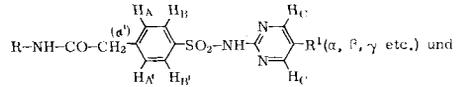
⁹⁾ W. Heptner, O. Christ und D. Weihrauch, *Arzneim.-Forsch.* **19**, 1400 (1969).

¹⁰⁾ G. Pataki, *J. Chromatogr.* **12**, 541 (1963).

Tab. 5. Elementaranalysen und physikalische Daten

Verbindung	Summenformel (Mol.-Masse)	C	H	O	N	S	F	ν /OH	ν /NH(CO)	ν /NH(SO ₂)	IR-Daten in KBr [cm ⁻¹] ν /(Amid I) ν /(Amid II)	ν /SO ₂	ν
6	C ₂₃ H ₂₅ O ₅ N ₄ SCl (504.9)	Ber. 54.70 Gef. 52.70	4.99 5.33	15.84 16.14	11.09 11.14	6.35 6.78	7.02 7.23	3450	3390	3150—2500	1680	1330/1155	945
6	C ₂₃ H ₂₅ O ₅ N ₄ SCl (520.9)	Ber. 53.00 Gef. 52.31	4.83 5.30	18.42 16.68	10.75 10.68	6.14 6.80	6.80	3470	3390	3150—2500	1675	1330/1160	945
7	C ₂₃ H ₂₅ O ₅ N ₄ SF (488.5)	Ber. 56.50 Gef. 56.11	5.15 5.32	19.65 19.24	11.46	6.56	3.88	3450	3390	3150—2500	1675	1330/1160	945
8	C ₂₄ H ₂₈ O ₅ N ₄ S (484.5)	Ber. 59.40 Gef. 58.74	5.82 6.02	16.51 16.73	11.56 11.39	6.61 7.07	— <0.3	3455	3390	3150—2500	1675	1330/1155	945
17	C ₂₂ H ₂₃ O ₅ N ₄ SCl (490.9)	Ber. 53.80 Gef. 54.11	4.72 4.83	16.29 16.42	11.41	6.52	7.22	3460	3360	3150—2500	1670	1330/1155	945
18	C ₂₂ H ₂₃ O ₅ N ₄ SCl (490.9)	Ber. 53.80 Gef. 53.50	4.72 4.87	16.29 16.01	11.41	6.52	7.22	3440	3380	3150—2500	1675	1330/1155	945
19	C ₂₁ H ₂₁ O ₅ N ₄ SCl (476.9)	Ber. 52.80 Gef. 52.29	4.43 4.74	16.77 16.89	11.74 12.07	6.72 7.43	7.43	3450	3370	3150—2500	1675	1330/1155	945
20	C ₂₂ H ₂₃ O ₅ N ₄ SCl (490.9)	Ber. 53.80 Gef. 53.66	4.72 4.84	16.29 16.52	11.41	6.52	7.22	3450	3390	3150—2500	1675	1330/1155	950
21	C ₂₃ H ₂₅ O ₅ N ₄ SCl (504.9)	Ber. 54.70 Gef. 54.35	4.99 5.36	15.84 15.64	11.09	6.35	7.02	3450	3390	3150—2500	1680	1330/1155	945
22	C ₂₄ H ₂₇ O ₅ N ₄ SCl (519.0)	Ber. 55.50 Gef. 55.26	5.24 5.21	15.41 15.32	10.79	6.17	6.83	3480	3390	3150—2500	1675	1335/1160	945
23	C ₂₃ H ₂₅ O ₅ N ₄ SCl (504.9)	Ber. 54.70 Gef. 54.14	4.99 5.17	15.84 15.84	11.09 11.36	6.35 7.36	7.02	3540	3390	3150—2500	1660	1335/1160	950
24	C ₁₉ H ₁₇ O ₅ N ₄ SCl (448.9)	Ber. 50.84 Gef. 50.21	3.82 3.81	17.82 17.85	12.84 12.34	7.13 7.10	7.91 8.44	3410	3340	3150—2500	1650	1330/1155	940
26	C ₂₃ H ₂₅ O ₅ N ₃ SCl (510.0)	Ber. 54.10 Gef. 54.09	5.53 5.42	18.82 18.63	8.43	6.28	6.95	3400	3380	3150/3110	1660	1335/1160	950
27	C ₂₃ H ₂₅ O ₅ N ₃ SCl (510.0)	Ber. 54.10 Gef. 45.72	5.53 4.18	18.82 13.52	8.43 6.43	6.28 7.36	6.95 23.07	3410	3380	3150/3110	1660	1335/1165	940
28	C ₁₆ H ₁₇ O ₄ N ₂ SCl (368.9)	Ber. 52.00 Gef. 45.57	4.64 4.23	17.34 13.51	7.59 6.48	8.69 7.42	9.61 23.00	3410	3350	3150/3110	1660	1335/1165	940
30	C ₁₃ H ₁₅ O ₄ N ₃ S (309.3)	Ber. 50.40 Gef. 50.06	4.88 5.11	20.68 19.55	13.58 13.85	10.43 10.68	—	—	3370	3350—3050	1630	1340/1160	945

Tab. 6. NMR-Spektroskopische



Nr.	Lösungs- mittel	δ_{HNCO}	$\delta_{\text{CH}_2(\beta')}$	$\delta_{\text{CH}_2(\alpha')}$	$\delta_{\text{H}_A\text{H}_{A'}}$	$\delta_{\text{H}_B\text{H}_{B'}}$	δ_{H_C}
6	Aceton-d ₆	8.78 s breit		3.91 s	7.57 m (10)	8.11 m (10)	8.45 s
b)	Aceton-d ₆	8.76 s breit		3.90 s	7.55 m (10)	8.09 m (10)	8.54 s
7	Py-d ₅	9.58 s		3.95 s	7.54 m (10)	8.40 m (10)	8.51 s
8	Py-d ₅	9.46 s		3.97 s	7.61 m (10)	8.44 m (10)	8.54 s
17	DMSO-d ₆	9.56 s		3.87 s	7.50 m (10)	7.95 m (10)	8.55 s
18	DMSO-d ₆	9.55 s		3.87 s	7.50 m (10)	7.94 m (10)	8.37 s
19	DMSO-d ₆	9.52 s		3.87 s	7.50 m (10)	7.95 m (10)	8.45 s
20	DMSO-d ₆	9.52 s		3.86 s	7.49 m (10)	7.94 m (10)	8.31 s
21	DMSO-d ₆	9.52 s		3.87 s	7.50 m (10)	7.95 m (10)	8.32 s
22	DMSO-d ₆	9.53 s		3.87 s	7.51 m (10)	7.95 m (10)	8.30 s
23	DMSO-d ₆	9.44 s		3.86 s	7.50 m (10)	7.95 m (10)	8.29 s
24	Py-d ₅	9.72 s		4.01 s	7.61 m (10)	8.46 m (10)	8.38 s
26	DMSO-d ₆	8.22 t (6)	3.56 q (6.5)	2.93 t (7)	7.47 m (10)	7.85 m (10)	
27	DMSO-d ₆	8.21 t (6)	3.57 q (6.5)	2.94 t (7)	7.48 m (10)	7.85 m (10)	
28	DMSO-d ₆	8.18 t (6)	3.59 q (6.5)	2.94 t (7)	7.43 m (10)	7.81 m (10)	
30	DMSO-d ₆	8.68 t (6)	3.51 q (6.5)	2.92 t (7)	7.39 m (10)	7.75 m (10)	

a) Chemische Verschiebungen δ in ppm mit Tetramethylsilan als internem Standard; q = Quartett, qu = Quintett. Die rund eingeklammerten Zahlen sind die Kopplungskonstanten J in Hz, bei m bedeutet die Hz-Angabe die Halbwertsbreite $W_{1/2}$; die eckig eingeklammerten Zahlen geben die Protonenzahl an. Die Signallagen und Aufspaltungsmuster der Reste R entsprechen genau den Erwartungen.

b) 6, CH(OH)C(CH₃)₂OH statt CH₂C(CH₃)₂OH.

sterilen Bedingungen in einen 100-ml-Erlenmeyer-Kolben, gefüllt mit 20 ml Medium, übergeführt und wie vorher geschüttelt. Nach 6 h wurde je 1 ml sterilfiltrierte Substratlösung zugesetzt und weitere 18 bzw. 42 h geschüttelt. Nach Zusatz von 0.5 ml 2 N HCl wurde mit 4 ml Methylisobutylketon extrahiert. 10–20 μ l der Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch analysiert.

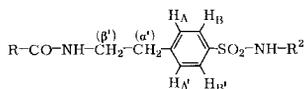
Nährlösungen

Für *Streptomyces* (Medium 100): 0.1% Pepton; 0.2% Cornsteep-Liquor; 0.5% Stärkezucker; 0.5% Hefeextrakt; pH nach Sterilisation 7.0–7.2. (Bei schlechtem Wachstum wurde teilweise als Anzuchtmedium der *Streptomyces* auch Medium 20 verwendet = 1% Stärkezucker; 0.1% Hefeextrakt; 0.1% Fleischextrakt; 0.2% Tryptose; pH nach Sterilisation 7.2. Als Reaktionsmedium wurde Medium 100 beibehalten.)

Substratlösungen: Die Sulfonamide wurden mit einem Äquiv. NaOH in Wasser gelöst zu einer Konzentration von 4 mg/ml und durch ein kleines Seitz-Plattenfilter sterilfiltriert. Die Substanzen 4 und 12–16 lösten sich unter diesen Bedingungen nicht vollständig und wurden in Wasser mit 10% Dimethylformamid und 1 Äquiv. NaOH gelöst.

b) Präparative Fermentationen im Schüttelkolben

Nach den unter a) beschriebenen Bedingungen wurden mit den ermittelten geeigneten Stämmen präparative Fermentationen in 2-l-Erlenmeyer-Kolben mit 500 ml Medienfüllung

Daten^{a)} der Sulfonamide

$\delta\text{CH}(\alpha)$	$\delta\text{CH}(\beta)$	R^1	$\delta\text{CH}(\gamma)$	$\delta\text{CH}(\delta)$	δNH_2	δCHO	R^2	δCH_2
2.64 s [2]			1.16 s [6]					
4.44 s [1]			1.14 s [6]					
			1.12 s [6]					
2.54 s [2]			1.17 s [6]					
2.56 s [2]			1.18 s [6]					
	1.40 s [6]							
	1.12 d (7) [3]							
	3.43 d (6) [2]							
4.64 q (6) [1]	1.32 d (6) [3]							
2.50 m [2]	3.42 m [1]		1.02 d (7) [3]					
2.50 m [2]	3.42 m [1]		1.32 qu (7) [2]	0.85 t (7) [3]				
2.37 s [2]			3.01 s [2]					
			0.73 s [6]					
2.36 s [2]			3.00 s [2]					
			0.73 s [6]					
						4.62 m (8)	0.84 – 1.30 m [4]; 1.30 – 2.00 m [4];	
						~3.60 m	1.40 – 2.00 m [4]; 2.10 – 2.44 m [4]	
					7.23 s			
					7.23 s			

und einem Substrateinsatz von 100 mg (200 mg/l Kulturbrühe) durchgeführt. In Abständen von einigen Stunden (2–20 h) wurden Proben genommen und dünnschichtchromatographisch analysiert, bis keine weitere Umsetzung mehr erfolgte (18–66 h Inkubationszeit). Die Kulturbrühe wurde mit 2 N H₂SO₄ auf pH 3–4 angesäuert und zweimal mit dem halben Volumen Methylisobutylketon extrahiert. Nach Filtration der Emulsion über Celite wurde die Extraktphase abgetrennt und i. Vak. bei 50°C maximaler Badtemp. zur Trockne eingengt.

Ein aus ca. 30 Schüttelkolben erhaltener Rohextrakt wurde entweder durch fraktionierte Kristallisation gereinigt oder an ca. 200 g Silikagel G mit 25- oder 100-ml-Fractionen chromatographiert.

Elutionssysteme

A = linearer Gradient aus 2.5 l Chloroform/Eisessig (98:2) und 2.5 l Chloroform/Aceton/Eisessig (78:20:2)

B = Chloroform/Aceton (1:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4)

C = Chloroform/Aceton (4:1)

D = linearer Gradient Chloroform und Chloroform/Aceton (1:1)

E = linearer Gradient Chloroform/Aceton (4:1) und Chloroform/Aceton (1:1)

c) Präparative Fermentationen in Jar-Fermentern

α) *Anzucht*: Ein 2-l-Erlenmeyer-Kolben wurde mit 500 ml des angegebenen Mediums beschickt, sterilisiert und mit einer Suspension des Pilz- oder Streptomycetenstammes – erhalten durch Abschwemmen einer Schrägagarkultur mit 4 ml physiologischer Kochsalzlösung – beimpft und 72 h bei 29°C und 145 U/min geschüttelt.

β) *Vorkultur*: Ein 20-l-Fermenter aus rostfreiem Stahl mit Glaswandung wurde mit 14.5 l des Mediums beschickt, durch halbständiges Erhitzen auf 120°C bei 1.1 atü sterilisiert und

bei 29°C mit 500 ml der Anzuchtkultur beimpft. Die Vorkultur wurde 30 h bei 29°C unter Rühren (220 U/min) und Belüftung (900 l/h) und 0.7 atü Druck vermehrt. Als Antischaummittel wurde Silicon SH verwendet.

γ) *Fermentation*: 1 l dieser Vorkultur wurde in einen gleichen Fermenter – beschickt mit 14 l sterilen Mediums der gleichen Zusammensetzung – unter sterilen Bedingungen übergeführt und unter Belüften wie oben gerührt. Nach 6 h wurde die Substratlösung zugesetzt (Substratkonzentration 200 mg/l Kulturbrühe) und unter gleichen Bedingungen fermentiert. Die Abbruchzeit wurde durch Intervall-Proben bestimmt, die dünn-schichtchromatographisch analysiert wurden. (Teilweise wurden auch 50-l-Fermenter aus nichtrostendem Stahl mit einem Füllvolumen von 30 l mit entsprechenden Volumenverhältnissen benutzt.)

δ) *Isolierung*: Die Kulturbrühe wurde zweimal mit jeweils dem halben Volumen Methylisobutylketon extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden i. Vak. bei 40°C eingedampft. Der Rückstand wurde durch fraktionierte Kristallisation oder durch Säulenchromatographie wie bei b) beschrieben gereinigt.

[441/72]