

Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

11. Mitteilung^{1, 2}: Megacidin

Von

**L. Ettlinger, E. Gäumann, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer,
L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser und H. Zähler**

Aus dem Forschungslaboratorium der CIBA-Aktiengesellschaft,
Pharmazeutische Abteilung Basel,
dem Institut für spezielle Botanik und dem
Organisch-chemischen Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule Zürich

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 5. November 1957)

Aus den Kulturfiltraten eines Streptomyceten, der mit keiner der bekannten Arten identifiziert werden konnte, wurde ein kristallines, neutrales, farbloses Antibioticum — das Megacidin — isoliert und durch analytische Daten sowie UV.- und IR.-Absorptionsspektren der Verbindung und ihres kristallinen Acetylderivates charakterisiert. Megacidin besitzt eine hohe spezifische Wirksamkeit gegenüber *Bacillus megatherium*.

Die Kulturfiltrate eines Streptomyceten, den wir mit keiner bekannten Art identifizieren konnten und den wir als Streptomyces Stamm ETH 6258 bezeichnen, enthalten ein neutrales lipophiles Antibioticum, das wir wegen seiner besonders ausgeprägten Wirkung gegen *Bacillus megatherium* Megacidin benannten.

Das rohe Antibioticum extrahierte man aus dem Kulturfiltrat mit Äthylenchlorid. Die Extrakte wurden zuerst durch Chromatographie an Aluminiumoxyd vorgereinigt und darauf einer *Craig*-Verteilung unterworfen. Die aktiven Fraktionen aus der Verteilung gaben schließlich durch Umlösen aus Äthylacetat-Äther das reine kristalline Megacidin.

Die analytischen Ergebnisse weisen auf eine Formel $C_{24}H_{38}O_{10}$ für Megacidin hin, die jedoch durch weitere Untersuchungen gesichert werden

¹ Herrn Prof. Dr. F. Wessely zum 60. Geburtstag gewidmet.

² 10. Mitt.: Helv. Chim. Acta 40, 1768 (1957).

muß. Berechnet auf diese Formel findet man 1 O-Methylgruppe und 2 aktive Wasserstoffatome. Die Oxydation nach *Kuhn-Roth* lieferte 3 Mol Essigsäure, es sind demnach wenigstens 3, wahrscheinlicher aber 4 oder mehr C-Methylgruppen anwesend.

Im UV.-Absorptionsspektrum liegt ein Absorptionsmaximum bei $217\text{ m}\mu$ ($\log \epsilon 3,94$) vor. Das Megacidin nimmt bei der katalytischen Hydrierung mit Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit 1 Mol Wasserstoff auf, wobei das Absorptionsmaximum im UV. ver-

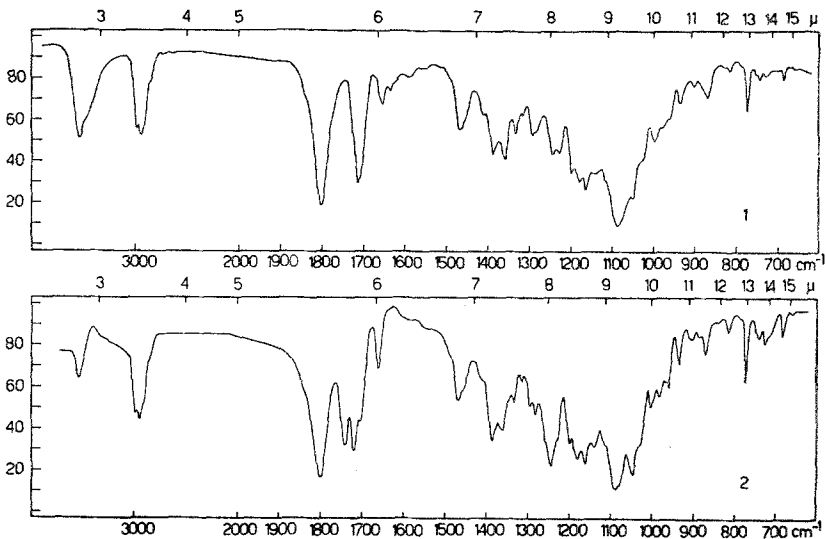


Abb. 1

schwindet. Das Verhalten bei der Hydrierung und die Tatsache, daß das Megacidin keine Gelbfärbung mit Tetranitromethan gibt, lassen auf die Anwesenheit eines α,β -ungesättigten Carbonyls schließen. Im $3\text{ }\mu$ -Gebiet des IR.-Absorptionsspektrums des Megacidins (Abb. 1, Kurve 1) findet man eine starke Hydroxylbande und im $6\text{ }\mu$ -Gebiet mindestens 3 verschiedenartige Carbonylbanden, von welchen besonders diejenige bei 1800 cm^{-1} bemerkenswert ist.

Bei der alkalischen Hydrolyse des Megacidins werden etwa 1,8 äquivalente Lauge verbraucht. Das Hydrolyseprodukt besteht aus mehreren Säuren, die sich papierchromatographisch trennen und nachweisen lassen, keine von ihnen wurde jedoch bisher kristallin erhalten. Es scheint, daß sich im Megacidin eine leicht verseifbare Ester- oder Laktongruppe befindet, weitere Lauge wird anscheinend durch tiefere Prozesse verbraucht.

Megacidin gibt mit Acetanhydrid-Pyridin ein Monoacetylderivat von der wahrscheinlichen Zusammensetzung $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_{11}$, das noch einen

nach *Zerewitinoff* bestimmbar aktiven Wasserstoff aufweist. Es enthält demnach wahrscheinlich 2 Hydroxyle, von welchen nur eines leicht acetylierbar ist. Das UV.-Absorptionsspektrum ändert sich nicht durch die Acetylierung. Im IR.-Absorptionsspektrum (Abb. 1, Kurve 2) tritt erwartungsgemäß eine neue, der Acetoxygruppe entsprechende Bande bei 1740 cm^{-1} auf.

Megacidin besitzt ein sehr enges Wirkungsspektrum gegen gewisse grampositive Bakterien *in vitro*. *Bacillus megatherium* wird durch 0,1 bis $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ccm}$ und *Streptococcus pyogenes* durch $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ccm}$ gehemmt. Gegenüber folgenden geprüften Mikroorganismen war dagegen noch mit $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ccm}$ keine Hemmung zu beobachten; *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella schottmülleri*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pestis*, *Vibrio comma*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium audouini*. Bei Versuchen *in vivo* an mit *Streptococcus pyogenes* infizierten Mäusen zeigte das Megacidin keine Wirksamkeit. Die Toxizität für Warmblüter ist gering: $0,5\text{ g}/\text{kg}$ s. c. werden von der Maus ohne Folgen ertragen.

Über weitere Untersuchungen an Megacidin werden wir in einer späteren Mitteilung berichten.

Bei der Isolierung und Reinigung des Megacidins fielen relativ große antibiotisch unwirksame Fraktionen an, die zum großen Teil aus Diketopiperazinen bestehen. Von diesen ließ sich besonders leicht das L-Leucyl-L-prolin-anhydrid durch Kristallisation aus Methanol in reinem Zustand gewinnen. Das L-Leucyl-L-prolin-anhydrid wurde schon öfters in der Natur gefunden, so z. B. in Kulturfiltraten von *Streptomyces*³, *Aspergillus*³ und *Rhizopus*⁴-Arten, in den Puppen des Seidenspinners⁵ und in den Extrakten aus Nebennierenrinde⁶, und es wurde auch synthetisch hergestellt⁷.

Ein weiteres in kleineren Mengen isoliertes Kristallinat wurde als ein nicht ganz reines Leucyl-leucin-anhydrid identifiziert.

³ J. L. Johnson, W. G. Jackson und T. E. Eble, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 2947 (1951).

⁴ S. H. Eppstein, D. H. Peterson, H. Marian Leigh, H. C. Murray, A. Weintraub, L. M. Reineke und P. D. Meister, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 421 (1953).

⁵ A. Butenandt, P. Karlson und W. Zillig, Z. physiol. Chem. **288**, 279 (1951).

⁶ O. Wintersteiner und J. J. Pfiffner, J. Biol. Chem. **111**, 599 (1935). — M. H. Kuizenga, J. W. Nelson, S. C. Lyster und D. J. Ingle, *ibid.* **160**, 15 (1945).

⁷ E. Aberhalden und H. Sickel, Z. physiol. Chem. **159**, 163 (1926). — R. E. Neumann und E. L. Smith, J. Biol. Chem. **193**, 97 (1951).

Experimenteller Teil⁸

Beschreibung des Organismus. *Streptomyces* sp. ETH 6258 wurde aus einer Bodenprobe vom Murgtal, Kanton St. Gallen, isoliert. Der Stamm wird durch folgende Merkmale charakterisiert:

1. Sporen glatt; 2. Farbe des Luftmycel zimtbraun (cinnamoneus); 3. Sporenketten monopodial verzweigt mit Spiralen von 3 bis 4 lockeren Windungen; hie und da Quirle; 4. chromogen, das heißt melanoide Verfärbung peptonhaltiger Nährböden durch Tyrosinase.

Synthetischer Agar⁹: Wachstum anfangs punktförmig, farblos bis milchweiß, Luftmycel grauweiß; später punktförmig, hellgelb, Luftmycel kreideweiß.

Synthetische Lösung: Sediment, Flocken milchweiß, feine Trübung.

Glucosebrühe: Wachstum sehr spärlich, feines Sediment.

Glucoseagar: Wachstum runzelig, kastanienbraun; Substrat rötlichbraun; Luftmycel sammetig, kreideweiß bis blaßkarmin, schließlich zimtbraun.

Glucose-Asparagin-Agar: Wachstum schleierartig, sattgelb; Substrat hellgelb; Luftmycel staubig, weißgrau.

Calciummalatagar: Wachstum punktförmig, hellgelb bis hellorange bis rötlichbraun; Luftmycel sammetig, kreideweiß.

Gelatinestich (18° C): Oberflächenwachstum pustelig, kastanienbraun; kein Luftmycel; Substrat dunkelbraun; Verflüssigung Spur nach 12 Tagen, 1 cm nach 34 Tagen.

Stärkeplatte: Wachstum punktförmig bis pustelig, hellbraun; Luftmycel spärlich, weißgrau; Hydrolyse Spur nach 4 Tagen, 4 mm nach 10 Tagen.

Nähragar: Wachstum punktförmig, bräunlichgelb, feucht aussehend; kein Luftmycel; Substrat hellbraun.

Kartoffeln: Wachstum kräftig, runzelig, gelblich-rostbraun; kein Luftmycel; Substrat dunkelbraun.

Karotten: kein Wachstum.

Lackmusmilch: Wachstum spärlich; Koagulation langsam, keine Peptonisierung; Lackmus blau.

Tabelle 1

Kohlenstoffquelle	Wachstum	Kohlenstoffquelle	Wachstum
L-Xylose	—	Inulin	—
L-Arabinose	—	D-Mannit	—
L-Rhamnose	—	D-Sorbit	—
D-Fructose	(—)	Dulcit	—
D-Galactose	+	Mesoinosit	—
Saccharose	+	Salicin	—
Maltose	+	Natriumacetat	(—)
Lactose	—	Natriumcitrat	+
Raffinose	—	Natriumsuccinat	+

Legende: + = gutes Wachstum, sichere Verwertung der betreffenden C-Quelle;

(+) = schwaches Wachstum, Verwertung fraglich;

(—) = sehr schwaches Wachstum, Verwertung unwahrscheinlich;

— = kein Wachstum, keine Verwertung.

⁸ Alle Schmp. wurden unter dem Mikroskop bestimmt.

⁹ Rezepte und Terminologie nach W. Lindenbein, Arch. Mikrobiol. 17, 361 (1952).

Die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen¹⁰ ist in Tabelle 1 angegeben.

Stamm ETH 6258 stimmt in den wichtigsten Merkmalen (Morphologie der Sporen, Farbe und Morphologie des Luftmycels) mit *Streptomyces fradiae* (*Waksman et Curtis*) *Waksman et Henrici* überein. Als authentische Stämme dieser Art haben wir die Kulturen ATCC 10475 und NRRL B-1195 zum Vergleich herangezogen. Sie unterscheiden sich von ETH 6258 durch negative Tyrosinasereaktion und gewisse Differenzen im C-Quellenspektrum. Außerdem ließ sich bei ihnen nie die Bildung von Quirlen beobachten.

Andererseits weist ETH 6258 gewisse Ähnlichkeiten zu *S. lavendulae* (*Waksman et Curtis*) *Waksman et Henrici* auf. Diese Art besitzt ebenfalls glatte Sporen und rosa bis zimtbraunes Luftmycel, bildet Spiralen und ist, im Gegensatz zu *S. fradiae*, chromogen (Tyrosinase positiv) wie ETH 6258. Was sie aber deutlich von ETH 6258 wie auch von *S. fradiae* unterscheidet, ist der morphologische Typus des Luftmycels: dichotome Verzweigungen, enge, kurze Spiralen an den Enden langer, gerader bis leicht gebogener Sporenketten.

Es wird wohl unumgänglich sein, für ETH 5258 eine neue, von *S. fradiae* durch den Verzweigungstyp sowie durch Chromogenität abgegrenzte Art aufzustellen. Hierfür sind die Resultate von Untersuchungen abzuwarten, die über die Konstanz dieser Merkmale im Gange sind.

Züchtung. Zur Herstellung des Megacidins wurde der Stamm ETH 6258 in Gärtankkulturen bei 27° C 3 Tage auf einer Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet: 20 g Cornsteep-Trockensubstanz, 10 g Rohglucose, 10 g Sojamehl, 10 g Calciumcarbonat, 1 g Natriumchlorid, 1 l Leitungswasser¹¹.

Isolierung und Reinigung. 2400 l Kulturfiltrat, das man aus den Kulturen durch Abfiltrieren des Mycels mit einer Filterpresse erhielt, wurden mit Äthylchlorid extrahiert, der Auszug im Vakuum konzentriert und der Rückstand in Benzol gelöst. Zur Entfernung von kaum aktiven basischen Begleitstoffen wurde die benzolische Lösung mit 0,5 n Essigsäure ausgeschüttelt und zur Trockne eingedampft, wobei 27 g eines dickflüssigen, braunen Öls zurückblieben. Aus einem zweiten gleich großen Ansatz wurden 43 g des entsprechenden Rohproduktes erhalten. Die beiden Rohprodukte wurden zuerst an je 1 kg Aluminiumoxyd (Aktivität III, neutral) in benzolischer Lösung chromatographiert. Als Eluierungsmittel wurden 2 l Benzol, 2,5 l Chloroform (über Phosphorpentoxyd destilliert), 1,5 l Chloroform-Methanol (50 : 1) und 1 l Methanol verwendet. Die stark antibiotisch aktiven Chloroform-Methanol (50 : 1)-Eluate wurden vereinigt und an 500 g Aluminiumoxyd (Aktivität IV) chromatographiert. Die aktive Verbindung befand sich nun in Chloroformeluat und wurde zur weiteren Reinigung einer *Craig*-Verteilung unterworfen. 9,15 g der Substanz wurden über 127 Stufen mit einem zweiphasigen Lösungsmittelsystem verteilt, das durch Mischen von 4 l Methanol, 1 l Wasser, 3 l Tetrachlorkohlenstoff und 2 l Chloroform bereitet worden war. Die antibiotische Aktivität war hauptsächlich in den Fraktionen 44 bis 65 konzentriert mit einem Aktivitäts-

¹⁰ Methodik nach *T. G. Pridham* und *D. Gottlieb*, *J. Bacteriology* **56**, 107 (1948).

¹¹ Eingehendere Angaben über die Züchtung: *Helv. Chim. Acta* **38**, 935 (1955).

maximum in Fraktion 55. Die Fraktionen 44 bis 55 wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit Chloroform ausgezogen und die Chloroformauszüge getrocknet und eingedampft. Es blieben 1,6 g eines gelblichen Schaumes zurück, der in 10 ccm Äthylacetat gelöst und mit 100 ccm Äther versetzt wurde, wodurch 615 mg kristallines, nicht ganz reines Megacidin erhalten werden konnten. Aus den Fraktionen 56 bis 65 ließen sich auf analoge Weise 2,76 g eines gelblichen Sirups gewinnen, aus welchen 462 mg kristallines Megacidin ausfielen. Durch Aufarbeitung der Mutterlaugen erhielt man weitere 262 mg des Kristallisates, was die Ausbeute auf 1,34 g erhöhte. Das reine Megacidin wurde daraus durch Umkristallisieren aus Äthylacetat-Äther in Form dünner Blättchen vom Schmp. 162 bis 164° erhalten.

Bei der Papierchromatographie mit System B₃ nach Bush¹² verhielt sich das so gereinigte Megacidin als eine einheitliche Verbindung mit $R_f = 0,77$. Der Nachweis erfolgte auf mikrobiologischem Wege mit *Bacillus subtilis* als Testorganismus; optimale Menge des Antibioticums 20 bis 30 µg.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 90° getrocknet. $[\alpha]_D = -51^\circ$ ($c = 0,958$, Feinsprit).

C₂₃H₃₈O₁₀ (486,54).

Ber. C 59,24, H 7,87, 2 akt. H 0,42, CH₃O 6,38, 3 CH₃-(C) 9,27.

Gef. C 59,14, 59,37, 59,29, H 8,05, 7,93, 7,83, akt. H 0,42, CH₃O 6,52, CH₃-(C) 9,38.

Das UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit weist ein λ_{\max} 217 mµ (log ϵ 3,94) auf. Das IR.-Absorptionsspektrum in KBr ist in Abb. 1, Kurve I, abgebildet.

Das Megacidin zeigt weder mit Tetranitromethan noch mit Eisen(III)-chlorid eine Farbenreaktion. Bei der Mikrohydrierung in Feinsprit mit einem Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator wurden 1,025 bzw. 1,053 Mol Wasserstoff aufgenommen. Im Hydrierungsprodukt war das hohe Absorptionsmaximum bei 217 mµ nicht mehr anwesend.

Saure Hydrolyse. 3,7 mg Megacidin wurden mit 1 ccm 0,5 n Schwefelsäure 4½ Stdn. auf 100° erwärmt. In einem Papierchromatogramm des Hydrolysats konnten mit Silbernitrat-Ammoniak-Lösung keine reduzierenden Zucker nachgewiesen werden¹³.

Alkalische Hydrolyse. 99 mg Megacidin wurden mit 1 ccm zirka 1,6 n Kalilauge und 3 ccm Methanol 3½ Stdn. gekocht. Durch Rücktitration mit 0,1 n Salzsäure wurde festgestellt, daß 1,77 äquivalente Kalilauge verbraucht worden sind. Die durch Aufarbeitung des Hydrolyseproduktes erhaltenen Säuren bildeten ein helles, zähflüssiges Öl, das bei der Papierchromatographie mit einem Alkohol-Ammoniak-Wasser (8 : 1 : 1)-Gemisch und Entwickelung mit Methylrot¹⁴ eine Hauptkomponente mit $R_f = 0,83$ und Nebenprodukte mit $R_f = 0,35$ bzw. 0,0 aufwies.

Acetyl-megacidin. 143 mg Megacidin wurden mit 5 ccm Acetanhydrid und 5 ccm Pyridin über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsprodukt wurde von den überschüssigen Reagenzien im Vakuum

¹² I. E. Bush, Biochemic. J. 50, 370 (1952).

¹³ S. M. Partridge, Biochemic. J. 42, 238, 251 (1948).

¹⁴ A. R. Jones, E. J. Dowling und W. J. Skraba, Analyt. Chemistry 25, 394 (1953).

befreit. Durch Umkristallisation des Rückstandes aus Aceton-Petroläther erhielt man 75 mg farblose Kristalle, Schmp. 218,5 bis 220°. Zur Analyse wurde noch zweimal umkristallisiert und bei 90° im Hochvakuum getrocknet.

$C_{26}H_{40}O_{11}$. Ber. C 59,07, H 7,63, CH_3CO 8,14, akt. H 0,20.
Gef. C 58,97, 58,69, H 7,86, 7,69, CH_3CO 8,22, akt. H 0,25.

Das in Feinsprit aufgenommene UV.-Absorptionsspektrum wies ein λ_{max} 217 m μ (log ϵ 4,02) auf. Das IR.-Absorptionsspektrum in KBr ist in Abb. 1, Kurve 2, abgebildet.

Isolierung der Diketopiperazine. Die Chloroformeluate (19,1 g), die bei der ersten chromatographischen Reinigung des rohen Megacidins erhalten wurden, löste man in 200 ccm Methanol. Man entfärbte die Lösung mit 5 g Aktivkohle, filtrierte sie durch Celite und engte sie auf 50 ccm ein. Das *L-Leucyl-L-prolin-anhydrid* kristallisierte daraus in großen sechseckigen Tafeln. Durch nochmaliges Umkristallisieren erhielt man 4,91 g eines Produktes, das zur Analyse noch dreimal umkristallisiert und im Hochvakuum bei 125° sublimiert wurde, Schmp. 158 bis 165°, $[\alpha]_D = -128^\circ$ ($c = 0,968$, Feinsprit).

$C_{11}H_{18}O_2N_2$. Ber. C 62,83, H 8,63, N 13,32, O 15,22, $CH_3-(C)$ 7,15.
Gef. C 62,98, H 8,75, N 13,58, O 15,11, $CH_3-(C)$ 4,33.

Das IR.-Absorptionsspektrum stimmte in allen Einzelheiten mit dem von *L-Leucyl-L-prolin-anhydrid* überein³.

10 mg der Substanz wurden mit 20%iger Salzsäure bei 110° über Nacht hydrolysiert. Im Papierchromatogramm des Hydrolysats ließen sich Leucin und Prolin nachweisen.

Aus den Fraktionen 66 bis 76 der *Craig*-Verteilung wurden bei der Aufarbeitung 1,30 g eines amorphen, gelblichen Produktes erhalten, die in 20 ccm Äthylacetat gelöst wurden. Beim Erkalten fielen 50 mg seidige Nadeln aus, die durch nochmaliges Umlösen und zweimalige Sublimation im Hochvakuum gereinigt wurden. Die Verbindung sublimierte bis 260°, ohne zu schmelzen.

$C_{12}H_{22}O_2N_2$. Ber. C 63,68, H 9,80, N 12,39.
Gef. C 63,67, H 9,73, N 12,54.

Das IR.-Absorptionsspektrum wies auf ein Diketopiperazin hin. In den Produkten der mit 4 mg Substanz ausgeführten Hydrolyse ließ sich papierchromatographisch neben viel einer Aminosäure der Leucingruppe noch eine kleinere Menge Valin nachweisen. Es handelt sich demnach um ein nicht ganz reines *Leucyl-leucin-anhydrid*.

Herrn *Dr. A. Stalder* danken wir für die Herstellung größerer Mengen von rohem Megacidin.

Die Analysen wurden in den mikroanalytischen Laboratorien der ETH (Leitung *W. Manser*) und der Ciba, Aktiengesellschaft (Leitung *Dr. H. Gysel*) durchgeführt. Die IR.-Absorptionsspektren wurden von *Frl. E. Aeberli* auf einem *Perkin-Elmer* double-beam Spektrographen 21 aufgenommen.